

**СОВРЕМЕННЫЕ
МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ
КАЧЕСТВА
ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**



О
Д
И
Н
П
Т

изд

**СОВРЕМЕННЫЕ
МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ
КАЧЕСТВА
ПИЩЕВЫХ
ПРОДУКТОВ**

ИЗДАТЕЛЬСТВО „ЭКОНОМИКА“ · МОСКВА—1976

6П9.85
С56

Авторами книги являются *И. А. Снегирева*,
Ю. Н. Жванко, *Т. Г. Родина* и *А. Н. Рукосуев*
(Заочный институт советской торговли), *О. Б. Це-*
ревитин и *В. Д. Михайлов* (Всесоюзный научно-
исследовательский институт проблем хранения).

С $\frac{31700-105}{011(01)-76}$ 160—76

© Издательство «Экономика», 1976 г.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Значение современных методов исследования пищевых продуктов <u>А. Н. Рукоусев</u>	3
2. Спектральные методы исследования пищевых продуктов (О. Б. Церевитинов)	6
2.1. Абсорбционная спектроскопия	6
2.2. Источники ошибок спектрального анализа	24
2.3. Инфракрасная спектроскопия	27
2.4. Атомно-абсорбционная спектроскопия	34
3. Хроматографические методы исследования пищевых продуктов (И. А. Снегирева)	47
3.1. Основы теории и виды хроматографии	47
3.2. Газовая хроматография (ГХ)	50
3.3. Распределительная хроматография на бумаге (Т. Г. Родина)	103
3.4. Тонкослойная хроматография (ТСХ)	113
3.5. Колоночная хроматография	141
4. Люминесцентные методы исследования пищевых продуктов (Т. Г. Родина)	158
4.1. Основы метода	158
4.2. Определение доброкачественности пищевых продуктов	162
4.3. Определение химического состава пищевых продуктов	165
4.4. Флуоресцентные и хемилюминесцентные индикаторы	173
5. Реологические методы исследования пищевых продуктов (Ю. Н. Жванко)	174
5.1. Основные понятия реологии	174
5.2. Типы структур и методы определения реологических свойств	176
5.3. Приборы для определения основных реологических характеристик	179
6. Приборы и технические средства для контроля качества пищевых продуктов (В. Д. Михайлов)	200
6.1. Классификация автоматизированных методов определения состава и свойств пищевых продуктов	200
6.2. Требования к техническим средствам для автоматизированного контроля	200
6.3. Дистанционное измерение температуры и влажности сыпучих пищевых продуктов	202
Литература	209
Предметный указатель	219

Одной из основных задач, поставленных XXV съездом КПСС на десятую пятилетку, является улучшение качества всех видов выпускаемой продукции.

В широкое понимание проблемы качества включается и повышение качества продуктов питания.

В современных условиях проблемы определения качества, рационального использования, повышения питательной ценности и потребительных достоинств пищевых продуктов решаются на основе глубокого исследования их состава, физико-химических и реологических свойств с использованием современных методов анализа.

Необходимость их применения определяется тем, что питательная ценность продукта зависит прежде всего от содержания усвояемых веществ и элементов в оптимальном соотношении. Однако данные А. А. Покровского [164] о сбалансированном содержании питательных веществ и элементов в среднем суточном рационе питания подтверждают, что питательная ценность продуктов зависит не только от общего содержания белков, жиров, углеводов, макро- и микроэлементов, витаминов, но и в меньшей степени от аминокислотного состава белка, жирнокислотного состава липидов и т. д.

Комплексное же исследование продуктов возможно лишь на основе использования современных методов анализа, преимущественно физико-химических. Такие методы позволяют глубоко изучить структуру веществ, входящих в состав каждого продукта, и сделать объективную оценку его состава и свойств.

Из них наиболее широко применяются хроматографические методы в различных модификациях — от наиболее простых (хроматография на бумаге и в тонких слоях) до наиболее сложных автоматизированных (газовая и высокоскоростная жидкостная хроматография). Современные хроматографы автоматически записывают жирнокислотный состав липидов, аминокислотный состав белков и могут быть применены для определения углеводов, кислот, ароматических и других соединений.

Чрезвычайно велико значение, широка область применения и перспективы использования спектроскопических и спектро-

фотометрических методов исследования, позволяющих с большой точностью находить качественное содержание макро- и микроэлементов, концентрацию веществ и их качественные особенности.

К числу перспективных относятся также методы люминесцентного анализа, основанного на обнаружении и количественном определении состава веществ по их люминесценции. Преимуществом этого метода является высокая чувствительность, что дает возможность распознать неощутимое по вкусу и запаху изменение веществ продукта и использовать его для диагностики порчи продуктов питания, а также для определения витаминов и других веществ.

Потребительные достоинства продуктов тесно связаны с их консистенцией, обусловленной структурно-механическими свойствами — прочностными, упругими, пластическими, вязкостными. Во многих случаях при постоянном содержании питательных, вкусовых и ароматических веществ решающую роль в оценке потребительных достоинств, например, хлеба, кондитерских изделий, мясных и многих других продуктов имеют структурно-механические свойства. Основываясь на реологических исследованиях, можно не только охарактеризовать консистенцию продукта, но и получать продукты практически с любой заданной консистенцией.

Современные методы исследования незаменимы и для установления безвредности продуктов в связи с возможным попаданием в них различных химических соединений, применяемых для борьбы с вредителями сельского хозяйства (пестициды), радиоактивных изотопов, а также искусственных красителей, химических консервантов, полициклических ароматических углеводородов.

Применение современных методов исследования пищевых продуктов позволяет не только глубоко изучить их свойства, качество и пищевую ценность, но и вскрыть изменения состава и реологических свойств, не обнаруживаемые органолептическими или обычными физическими и химическими методами, прогнозировать изменение качества, установить способы хранения и сроки использования. В контроле процессов хранения большое значение приобретают дистанционные методы определения температуры, влажности и других условий хранения (освещенности, состава и движения воздуха), на основе которых могут быть обеспечены оптимальные режимы хранения.

Надлежащее использование современных методов исследования в научных целях, применение их в практике производства, хранения и реализации в торговле и общественном питании должны явиться основой для коренного повышения качества пищевых продуктов, улучшения их питательной ценности, потребительных достоинств, обеспечения сохранности и использования ресурсов питания с наибольшей эффективностью.

Роль и значение проблемы качества пищевых продуктов неизменно возрастают с дальнейшим развитием социалистической экономики. Учитывая это, авторы поставили перед собой задачу — изложить в удобной для практического применения форме современные физико-химические методы исследования качества пищевых продуктов.

В книге освещены некоторые вопросы теории и практическое приложение спектральных, хроматографических, люминесцентных и реологических методов для определения качества пищевых продуктов. Описанию каждого метода предшествует краткое теоретическое введение, цель которого — дать физическое обоснование описываемого явления и процесса, после чего приводятся конкретные методики. Такое изложение материала поможет читателю разобраться в основах методов и рационально использовать их при исследовании практически любых пищевых продуктов.

Хотя общая идея книги едина на протяжении всех разделов, каждый из них имеет самостоятельное значение. Поэтому любой из вопросов, рассмотренных в книге, может быть изучен самостоятельно без проработки всего материала в целом.

* * *

Отзывы и пожелания просьба направлять по адресу: Москва 121864, Бережковская набережная, 6, издательство «Экономика», редакция литературы по товароведению.

2

СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Среди современных методов физико-химических анализов все большее распространение приобретает спектроскопия, позволяющая получить наиболее полную информацию о важнейших свойствах продукта.

Спектральный анализ используется для определения разнообразных органических соединений, а также минеральных элементов с концентрацией 10^{-2} — 10^{-6} моля.

2.1. АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

2.1.1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АБСОРБЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Спектроскопию условно можно разделить на эмиссионную и абсорбционную.

Эмиссионная спектроскопия исследует излучательную способность вещества. Испускание энергии связано с предварительным термическим или энергетическим возбуждением атомов, когда электроны с основного уровня переходят при поглощении энергии на более высокий энергетический уровень.

Абсорбционная спектроскопия исследует поглощательную способность вещества. При этом анализируемую пробу помещают между источником электромагнитного излучения с определенным диапазоном частот и спектрометром. Спектрометр измеряет интенсивность света, прошедшего через пробу, в сравнении с источником первоначального излучения при заданной длине волны (рис. 1).

Для исследования свойств пищевых продуктов наибольший интерес представляют области: видимая (200—400 нм) со стеклянной оптикой, ультрафиолетовая (400—800 нм) с кварцевой оптикой и инфракрасная (2—15 мкм).

Несмотря на то что механизмы взаимодействия излучения с веществом в различных областях отличаются друг от друга, в любом случае происходит поглощение молекулами определенного количества энергии.

При поглощении света внутренняя энергия атома или молекулы скачкообразно повышается от нормального уровня E_0 до более высокого E_1 . Величина поглощенной энергии пропорциональна частоте света:

$$E_1 - E_0 = h\nu, \quad (1)$$

где h — универсальная постоянная Планка, равная $6,624 \times 10^{-27}$ Эрг/сек;

ν — частота падающего света, Гц или см^{-1} .

Частота ν и длина волны λ связаны соотношением

$$\nu = \frac{C}{\lambda}, \quad (2)$$

где C — скорость света, равная $2,998 \cdot 10^{10}$ см/сек.

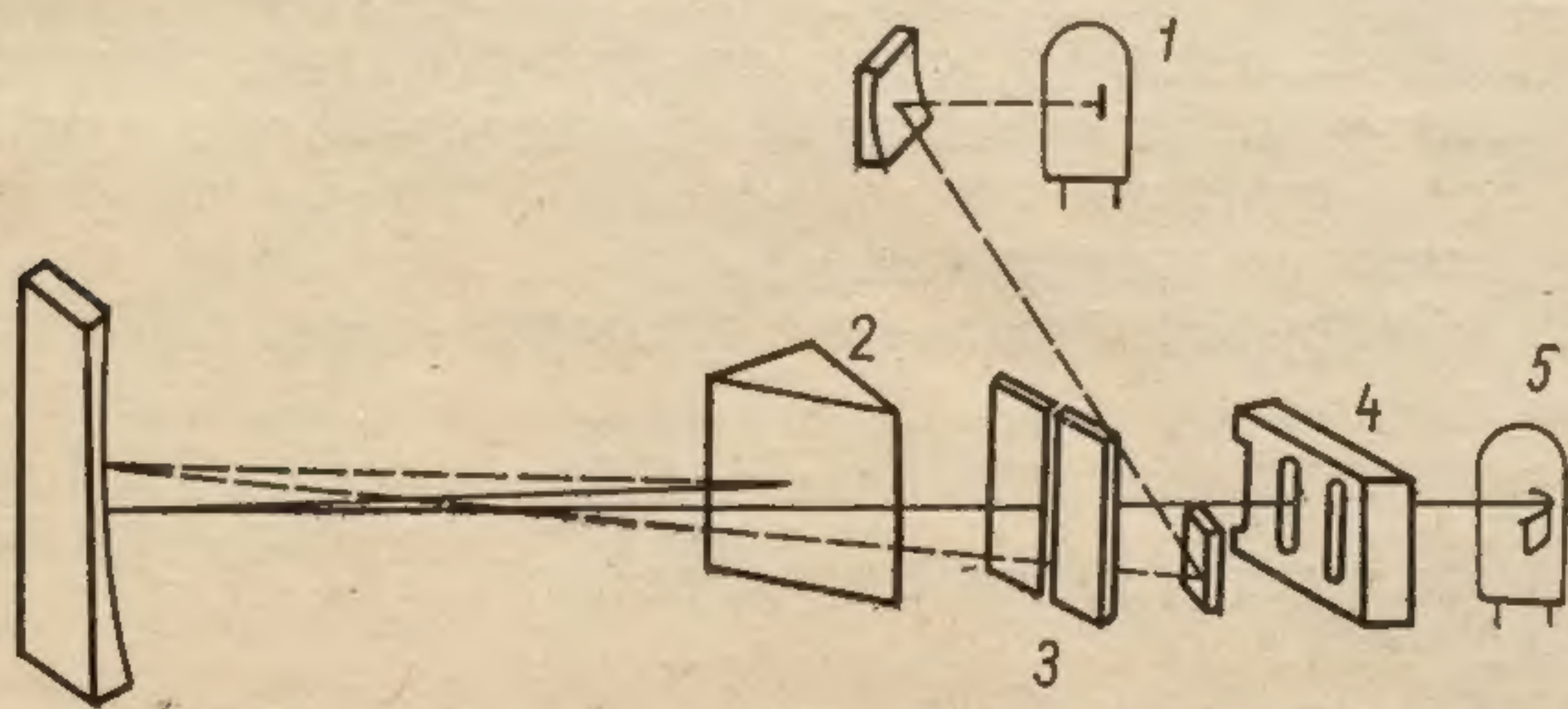


Рис. 1. Схема фотоэлектрического спектрофотометра:

1 — источник света; 2 — призма; 3 — щель; 4 — держатели с кюветами; 5 — фотоэлемент

Для каждой группы веществ (молекул) характерны колебательные и вращательные состояния, различающиеся сравнительно небольшой энергией, поэтому группа молекул поглощает или выделяет энергию в определенных участках спектра. Однако функциональные группы в различных молекулах не всегда дают поглощения при совпадающих длинах волн. Это объясняется тем, что длина волны поглощения каждой группы веществ определяется энергией перехода, а в различных молекулах электронные переходы различаются по энергетическим характеристикам вследствие неравноценности их окружения. Поглощение в видимой и ультрафиолетовой областях связано с возбуждением электронов, поэтому их спектры выдают ограниченную информацию о строении молекул. Поглощение в инфракрасной области связано с молекулярными колебаниями, а соответствующие им спектры представляют больше сведений о строении соединений.

Основной закон спектроскопии

В основе всей спектроскопии поглощения в области оптических спектров лежат общие законы, устанавливающие соотношение между величиной поглощения и количеством поглощающего вещества.

Первый закон выражает зависимость между поглощающей способностью и толщиной слоя вещества — закон Бугера — Ламберта, открытый в 1729 г. Бугером. Поток лучей монохроматического света, проходя через поглощающую среду, ослабляется по экспоненциальному закону:

$$I = I_0 \cdot e^{-Kl}, \quad (3)$$

где I — интенсивность прошедшего излучения;

I_0 — интенсивность падающего излучения;

l — толщина поглощающего слоя;

K — коэффициент поглощения, зависящий от природы вещества и длины волны, но не зависящий от концентрации и представляющий индивидуальную характеристику веществ;

C — величина постоянная.

Логарифмируя это уравнение, находим

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = K'l, \quad (4)$$

где D — оптическая плотность раствора;

$K' = 2,303 K$.

Оптическая плотность показывает соотношение $\frac{I_0}{I}$ и зависит от толщины слоя. Этому закону подчиняются все вещества.

Второй закон, открытый в 1852 г. Бером, устанавливает связь поглощающей способности с концентрацией веществ в растворе. Коэффициент поглощения

$$K_1 = \epsilon C, \quad (5)$$

где C — концентрация вещества;

ϵ — коэффициент, не зависящий от концентрации.

Второй закон не имеет столь универсального значения, как первый. Нередки случаи отклонения, связанные с концентрацией веществ и с особенностями их поведения в растворе. Отклонение от закона Бера может происходить в результате межмолекулярного взаимодействия веществ в растворе, которое меняется с повышением концентрации. Окрашенные соединения могут диссоциировать в растворе с образованием бесцветных ионов. Некоторые вещества в концентрированных растворах способны образовывать комплексы, которые меняют спектр поглощения. Светопоглощение веществ может зависеть от концентрации водородных ионов в растворе. В таких случаях используют буферные растворы для поддержания определенного рН.

Для проверки закона Бера необходимо установить зависимость оптической плотности от концентрации. На спектрофотометре снимают кривую поглощения растворов с различной концентрацией определяемых веществ. Выбирают несколько длин волн, близких к максимальному поглощению, и строят графическую зависимость оптической плотности от концентрации. Если получается прямая линия, то закон Бера выполняется.

Объединяя формулы 3 и 5, получаем уравнение основного закона спектроскопии — закона Бугера—Ламберта—Бера:

$$I_x = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon C l}, \text{ или } \lg \frac{I_0}{I} = D = \varepsilon_\lambda C l. \quad (6)$$

Если концентрация выражена в молях, а толщина слоя в сантиметрах, то коэффициент ε называют молярным коэффициентом поглощения (погашения). Это постоянная величина, которая зависит от длины волны падающего света, температуры раствора, природы растворенного вещества и соответствует светопоглощению молярного раствора анализируемого вещества в кювете толщиной 1 см.

Если не известен молекулярный вес исследуемого сложного органического вещества, то интенсивность выражают как $\varepsilon_{1\%}^{1\text{ см}}$, что означает поглощение света 1%-ным раствором в кювете толщиной 1 см. Эта величина легко переводится в коэффициент молярной экстинкции по уравнению

$$\varepsilon = \varepsilon_{1\%}^{1\text{ см}} \cdot 0,1 \text{ М}. \quad (7)$$

Из уравнения 6 видно, что величина оптической плотности прямо пропорциональна концентрации веществ в растворе. Эта зависимость может быть представлена графически. Получаемая прямая линия свидетельствует о соблюдении закона Бугера—Ламберта—Бера. Если зависимость имеет криволинейный характер, то основной закон не соблюдается, и следует выбирать концентрации определяемых веществ, для которых зависимость оптической плотности от концентрации будет иметь прямую линию, проходящую через начало координат.

Молярный коэффициент поглощения

При графическом изображении зависимости оптической плотности от концентрации наклон прямой линии определяется толщиной кюветы и молярным коэффициентом поглощения. Продифференцировав уравнение 6 по C , получаем:

$$\frac{dD}{dC} = \varepsilon_\lambda l; \quad \frac{\Delta D}{\Delta C} = \varepsilon_\lambda l. \quad (8)$$

Следовательно, с изменением концентрации ΔC изменение оптической плотности тем больше, чем больше молярный коэффициент поглощения. Коэффициент же ε_λ имеет наибольшую величину

при длине волны, соответствующей максимальному поглощению. Поэтому при проведении количественного спектрального анализа с наибольшей точностью и чувствительностью измерение оптической плотности желательно проводить в области спектра, где поглощение лучей является максимальным.

Молярный коэффициент поглощения не зависит от концентрации веществ при прохождении света данной длины волны. Величина молярного коэффициента поглощения колеблется в широких пределах для разных соединений. Поскольку поглощение является безразмерной величиной, то размерность ϵ обратна размерности Cl , т. е. ϵ будет $= \lambda \cdot \text{моль}^{-1} \text{см}^{-1}$. Величина ϵ меняется от единиц до сотен тысяч. Молярный коэффициент поглощения является мерой чувствительности спектрального анализа. Чем больше величина ϵ , тем выше чувствительность определения. Поэтому правильный выбор длины волны имеет прямое отношение к чувствительности, которая рассчитывается по уравнению

$$C_{\text{мин}} = \frac{D_{\text{мин}}}{\epsilon_{\text{макс}} l_{\text{макс}}} \quad (9)$$

Например, определяют минимальные концентрации раствора диэтилдитиокарбамината меди на разных участках спектра (разные длины волн). Наименьшее значение оптической плотности $D_{\text{мин}}$, которое может быть измерено оптическим прибором для двух участков спектра, будет одинаково, l также одинакова. Тогда минимальные концентрации (по формуле 9) будут находиться в обратной зависимости от величины их молярных коэффициентов погашения:

$$\frac{C_{\text{мин } 436}}{C_{\text{мин } 540}} = \frac{\epsilon_{540}}{\epsilon_{436}} \quad (10)$$

Рассчитанные значения ϵ_{436} и ϵ_{540} оказались равны соответственно 12 800 и 1600. Подставляя эти значения в уравнение 10, получим

$$\frac{C_{\text{мин } 436}}{C_{\text{мин } 540}} = \frac{1600}{12800} = \frac{1}{8},$$

т. е. чувствительность определения меди в виде диэтилдитиокарбамината при $\lambda = 436 \text{ нм}$ в 8 раз выше, чем при $\lambda = 540 \text{ нм}$.

В табл. 1 представлены фотометрические величины, которые приняты в терминологии спектроскопии.

В иностранной литературе символы фотометрических величин несколько отличаются от отечественных: оптическая плотность (поглощаемость) вместо D обозначается A , коэффициент погашения вместо K — a , толщина кюветы вместо l — b .

Правильный выбор участка спектра для фотометрирования имеет исключительно важное значение в спектральном анализе. Форма кривой поглощения может иметь различный характер.

Таблица 1

Основные фотометрические величины

Термин	Символ	Формула
Оптическая плотность	D	$D^{++} = \lg \frac{I_0}{I} = KCl = -\lg T$
Пропускание	T	$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-KCl}$
Коэффициент погашения (поглощения)	K	$K^{++} = \frac{D}{C \cdot l}$
Молярный коэффициент погашения при длине волны	ϵ_λ	$\epsilon_\lambda^{+3} = \frac{D}{C \cdot l}$
Толщина поглощающего слоя (кюветы), см	l	—
Длина волны света, нм	λ	—

Примечания:

1. В отечественной и зарубежной терминологии иногда вместо термина «оптическая плотность» употребляют термин «экстинция» (E), а вместо термина «коэффициент погашения» — «коэффициент экстинции».

2. ++ В этих формулах концентрация (C) выражена в г/л, толщина слоя в см.

3. +3 В этой формуле концентрация (C) выражена в г-моль/л, толщина слоя в см.

Некоторые вещества дают сплошные поглощения без отчетливых максимумов и минимумов. В этом случае коэффициент поглощения почти не зависит от длины волны. Большинство органических соединений имеет избирательное поглощение с отчетливыми зонами максимума и минимума. Форма спектра обуславливается составом молекул и характером связи атомов в органических молекулах: простые и кратные, двойные и тройные связи. Электроны этих связей имеют различную энергию и возбуждаются излучением с различной длиной волны. Наибольшая энергия требуется для возбуждения электронов простой связи углерод-углерод. Поэтому спектры поглощения предельных углеводородов лежат в трудной для измерения ультрафиолетовой области с длиной волны менее 170 нм.

Поглощение хромофорных групп

Группы, вызывающие поглощение в области 200—800 нм, получили название хромофорных. Эти группы содержат не менее одной кратной связи: $C=C$, $C \equiv C$, $C=O$, $C \equiv N$, $N=O$, $N=N$, $C=S$, $S=O$, SO_2 , NO_2 и др. Энергия возбуждения электронов кратных связей существенно меньше энергии возбуждения простых связей. Характер спектра поглощения определяется наличием в анализируемом соединении таких кратных связей. Известно, что накопление в молекуле двойных связей вызывает

смещение спектра в длинноволновую сторону; так каждая двойная связь сдвигает спектр поглощения примерно на 30 нм. Например, бутадиен поглощает при 217 нм, а β -каротин, имеющий цепочку из одиннадцати $\text{CH}=\text{CH}$ -групп, дает максимум поглощения при 452 нм.

При выполнении анализов в видимой и ультрафиолетовой областях приходится иметь дело с сильно разбавленными растворами, в которых нельзя не учитывать особенности растворителя. Основными требованиями, предъявляемыми к растворителям, являются следующие: растворители не должны иметь собственных полос поглощения в области поглощения исследуемого соединения; не должны смещать максимум поглощения соединения; должны быть устойчивы при работе и легко подвергаться очистке.

В качестве растворителей в области выше 200 нм могут быть использованы предельные углеводороды, вода, спирт, эфиры. Насыщенные углеводороды благодаря отсутствию в них полярных групп практически не взаимодействуют с растворенным веществом и не искажают спектра. При использовании в качестве растворителей воды, спиртов, простых эфиров следует считаться с их влиянием на растворенное вещество, особенно если вещество имеет полярные группы. Полярный растворитель может смещать полосу поглощения анализируемого вещества и в сторону более коротких волн, и в длинноволновую область [83, 129].

2.1.2. ПРИМЕНЕНИЕ АБСОРБЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ АНАЛИЗА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Определение степени окисленности жира с 2-тиобарбитуровой кислотой

Метод основан на образовании окрашенных соединений 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК) с некоторыми из вторичных продуктов окисления жира. Степень окрашивания зависит от глубины окисления жира, в результате чего образуются альдегиды, основным из которых является моновольный альдегид. В спектре поглощения окрашенных соединений имеются два максимума при длине волны 450 нм и 535 нм. Первому максимуму (450 нм) соответствуют желтоокрашенные продукты реакции конденсации ТБК с моноальдегидами, а второму (535 нм) — красноокрашенные соединения ТБК с диальдегидами.

Данная реакция широко используется для оценки степени окисленности растительных и животных жиров вследствие высокой чувствительности, воспроизводимости и взаимосвязи этого показателя с органолептической оценкой свежести жиров. В связи с тем что механизм этой реакции полностью не известен, результаты анализов выражаются в относительных едини-

цах оптической плотности. Анализ степени окисленности жира различных продуктов с ТБК отличается особенностями подготовки пробы для измерения оптической плотности на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре. Это касается особенно метода выделения жира.

Определение степени окисленности жира молока

Определение основано на обработке молока ТБК в присутствии фосфорной кислоты, извлечении окрашенного продукта экстракционной смесью (изоамиловый спирт-пиридин в соотношении 2:1). Изоамиловый спирт не может экстрагировать окрашенные продукты реакции, абсорбированные белками молока. Пиридин облегчает экстракцию окрашенных соединений.

Реактивы: 0,05 М раствор 2-тиобарбитуровой кислоты в воде; 2 М раствор фосфорной кислоты; реактив 2-ТБК, приготовляемый из 0,05 М раствора и 2 М раствора фосфорной кислоты в соотношении объемов 1:1; реактив ТБК, который можно приготовить растворением 0,33 г 2-тиобарбитуровой кислоты в 1 М растворе фосфорной кислоты в колбе объемом 100 мл; экстракционная смесь (химически чистый изоамиловый спирт и 99%-ный пиридин в соотношении объемов 2:1).

Методика определения. 10 мл молока вносят пипеткой в пробирку на 40 мл, добавляют 5 мл реактива ТБК и тщательно перемешивают. Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 10 мин, после чего быстро охлаждают в холодной воде и добавляют 15 мл экстракционной смеси. Пробирку встряхивают не менее 10 мин, центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин. Оптическую плотность измеряют при $\lambda = 535-540$ нм (зеленый светофильтр). Контрольный раствор готовят одновременно с рабочим, но вместо молока добавляют 10 мл воды.

При определении степени окисленности жира сухого молока или сыра навеску берут соответственно 2 г и 6 г, добавляют 75 мл реактива ТБК и смесь перемешивают в течение 15 мин. Затем колбу помещают в кипящую водяную баню на час, отбирают 10 мл реакционной смеси и переносят в центрифужную пробирку, содержащую 10 мл экстракционной смеси. После встряхивания центрифугируют, прозрачную часть раствора помещают в кювету 1 см и измеряют величину оптической плотности.

Определение степени окисленности жира сливочного масла

Анализ сливочного масла с ТБК предусматривает либо предварительное выделение молочного жира, либо отгонку продуктов окисления, либо их экстракцию. Сравнительная оценка существующих методов показала преимущество экстракции, позволяющей наиболее полно выделить продукты окисления жиров, находящихся как в самом молочном жире, так и в плазме масла.

Реактивы: 1н. раствор соляной кислоты; петролейный эфир, реактив ТБК; экстракционная смесь (изоамиловый спирт и 99%-ный пиридин в соотношении объемов 1:1).

Методика определения. Навеску сливочного масла 10 г ($\pm 0,01$ г) помещают в центрифужную пробирку с притертой пробкой (лучше из термостойкого стекла) и выдерживают в горячей воде при температуре 70—80°С в течение 3 мин для полного расплавления молочного жира. После этого в пробирку добавляют 2 мл дистиллированной воды, 1 мл 1н. HCl, энергично встряхивают, повторно нагревают 1 мин и центрифугируют 3 мин (при 5000 об/мин). Слой молочного жира «обсасывают» пипеткой. Водную фракцию промывают несколькими порциями петролейного эфира до исчезновения видимых остатков жира. Эфир каждый раз удаляют пипеткой с отсасывающей грушей. По окончании промывания содержимое пробирки центрифугируют 2—3 мин для более полного удаления эфира.

В оставшуюся водную фракцию добавляют 1,5 мл реактива ТБК и выдерживают на водяной бане 15 мин. Пробирку быстро охлаждают до 18—20°С, приливают 5 мл экстракционной смеси, энергично встряхивают и центрифугируют 10 мин при 5000 об/мин.

Прозрачный, окрашенный раствор переносят пипеткой в кювету 1 см и измеряют оптическую плотность при $\lambda = 490$ нм, 535 нм и 580 нм. Контрольный опыт готовят в аналогичных условиях, но без масла, и вместо 2 мл воды добавляют 3,6 мл с учетом влаги сливочного масла.

Расчет действительной оптической плотности окрашенных соединений проводят по формуле

$$D = D_{535} - \frac{D_{490} + D_{580}}{2}, \quad (11)$$

где D_{535} — максимум поглощения окрашенного соединения при $\lambda = 535$ нм;

D_{490} и D_{580} — минимальное поглощение в спектре определяемого окрашенного соединения при $\lambda = 490$ нм и $\lambda = 580$ нм, их оптические плотности вычитаются для освобождения от фона.

Метод позволяет объективно оценивать качества масла при хранении [123].

Определение степени окисленности жиров с флороглюцином (по Крейсу—Лури)

Метод основан на реакции флороглюцина с альдегидами в кислой среде с образованием окрашенного комплекса [251].

Реактивы: концентрированная соляная кислота уд. веса 1,19; 1%-ный эфирный раствор флороглюцина; бутиловый спирт; сульфат натрия кристаллический.

Методика определения. Навеску жира 5—10 г взвешивают в химическом стаканчике на технических весах, переносят в делительную воронку на 100 мл и по разнице весов определяют взятую пробу.

В воронку приливают 5 мл концентрированной HCl, содержимое встряхивают 5 мин, добавляют 5 мл 1%-ного эфирного раствора флороглюцина и оставляют на 5 мин. Затем энергично встряхивают и дают отстояться до полного расслоения двух фаз: интенсивно окрашенный кислый слой и жировая фракция (может быть тоже слегка окрашена). Окрашенный нижний кислый слой осторожно сливают в другую делительную воронку (100—150 мл), добавляют 5 мл бутанола, встряхивают, приливают 25 мл дистиллированной воды и все тщательно перемешивают. Происходит расслоение: нижний водный слой, обычно неокрашенный или слабоокрашенный, и верхний бутаноловый слой с растворенным окрашенным комплексом.

Водную фазу сливают, а оставшийся бутаноловый слой начинают промывать водой, предварительно добавляя каждый раз по 5 мл бутанола. Промывают порциями воды по 25 мл пять—восемь раз до доведения pH промывной воды до 5 на pH-метре. Бутаноловая фракция содержит небольшие капельки воды в виде эмульсии. Для ее осушения добавляют 0,1—0,3 г сульфата натрия до получения прозрачного окрашенного слоя. Светлый слой раствора сульфата сливают, а оставшийся слой бутаноловой фракции переносят в мерный цилиндр и измеряют объем бутаноловой фракции. Спектр поглощения снимают на спектрофотометре при длине волны 548 нм в кювете 1 см.

Удельное поглощение вычисляют по формуле

$$E = \frac{D \cdot V}{p \cdot 100}, \quad (12)$$

где D — величина оптической плотности;

V — объем бутаноловой фракции;

p — навеска.

Определение пектиновых веществ карбазольным методом

Метод основан на характерной для уроновых кислот реакции с карбазолом в концентрированной H_2SO_4 . При действии концентрированной H_2SO_4 на пектиновые вещества образуется фурфурол, который вступает во взаимодействие с карбазолом и образует окрашенное соединение при длине волны 535 нм. Применение бората способствует быстрому развитию окраски, повышает ее стабильность (окраска сохраняется 16 часов), снижает влияние различных окислителей. Перед реакцией пектиновых веществ с карбазолом необходимо проводить дегидроксилирование их раствором едкого натра, что значительно повышает воспроизводимость результатов анализа и чувствительность.

Реактивы: химически чистая концентрированная H_2SO_4 уд. веса 1,84 (серную кислоту очищают добавлением 0,15 г мочевины на 100 мл кислоты и нагреванием смеси в течение часа); химически чистый натрий тетраборнокислый $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (если реактив не является химически чистым, то его перекристаллизовывают, для чего 100 г буры растворяют в 550 мл воды при 50—60° С, раствор фильтруют, охлаждают, кристаллы собирают в воронке Бюхнера; 250 г буры растворяют в 100 мл концентрированной H_2SO_4); 0,2%-ный раствор карбазола в абсолютном этаноле (раствор хранят в темноте до 12 недель); галактуроновая кислота (если препарат окрашен, то его перекристаллизовывают из спирта при 0—1° С); 0,05 н. раствор NaOH ; 0,05 н. раствор HCl ; 0,3 н. раствор HCl ; 1%-ный раствор лимоннокислого аммония.

Методика определения. Навеску 10 г свежего продукта (плодов, овощей) тщательно растирают со стеклом в ступке до однородной массы, переносят водой в коническую колбу или центрифужные пробирки, добавляют около 100 мл нагретой до 40° С воды и оставляют на 30 мин на водяной бане (лучше энергично взбалтывать 15—20 мин, после чего центрифугировать), сливают жидкость через фильтр в мерную колбу на 250 мл. Остаток повторно заливают водой, промывают фильтр и полученный фильтрат доводят водой до метки. Получается вытяжка водорастворимых пектиновых веществ.

Остаток из центрифужных пробирок переносят в коническую колбу на 50 мл 0,3н. раствором HCl , закрывают пробкой с обратным холодильником и помещают на 10 мин в кипящую водяную баню. После этого фильтруют через складчатый фильтр в мерную колбу на 250 мл, остаток промывают несколькими порциями воды. Фильтр и осадок переносят в экстракционную колбу, заливают 50 мл 1%-ного раствора лимоннокислого аммония и выдерживают 30 мин на кипящей водяной бане. Затем все смывают водой в ту же мерную колбу, фильтрат охлаждают и доводят водой до метки. При этом получается вытяжка, которая содержит нерастворимый протопектин и пектиновую кислоту.

В дальнейшем оба раствора анализируют одинаково. Для метоксилирования отбирают по 10 мл вытяжки в мерную колбу на 50 мл, добавляют 10 мл 0,05 н. раствора NaOH и выдерживают при комнатной температуре 30 мин, после чего добавляют 10 мл 0,05 н. раствора HCl и доводят водой до метки.

В три пробирки по 10 мл, помещенные в сосуды со льдом, отбирают по 0,5 мл исследуемого экстракта и осторожно по каплям приливают 3 мл концентрированной H_2SO_4 (не допуская перегрева смеси). Затем пробирки нагревают 6 мин на кипящей водяной бане и снова охлаждают льдом. В две пробирки добавляют по 0,1 мл 2%-ного раствора карбазола и все пробирки помещают на 10 мин в кипящую водяную баню. После охлаж-

дення измеряют оптическую плотность растворов при 535 нм в кювете 0,5—1 см.

Контролем служит пробирка без карбазола.

Содержание пектиновых веществ рассчитывается по калибровочному графику, построенному по галактуроновой кислоте с концентрацией от 5 до 50 мкг/мл [10].

Определение фенольных соединений в растительных продуктах

Существующие методы определения фенольных соединений должны учитывать особенности химического состава анализируемого продукта, а также большую химическую неоднородность веществ в составе обширной группы фенольных соединений. Несмотря на значительное количество методов определения общего содержания фенольных веществ, все эти методы имеют существенные недостатки. Поэтому многие исследователи отказываются от определения суммы дубильных веществ, а предлагают методы определения отдельных фенольных соединений (катехинов, лейкоантоцианов, антоцианов и флаванолов).

Ниже приведены отдельные методики, рекомендованные для продуктов с богатым содержанием фенольных соединений.

Для определения общего количества полифенолов используют реакции со следующими соединениями:

реактив Фолина, который готовят из 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ с добавлением 80 мл 85%-ной H_3PO_4 и 750 мл воды, смесь кипятят 3 ч с обратным холодильником и после охлаждения доводят объем водой до литра;

реактив Фолина — Дениса — 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 г фосфорномолибденовой кислоты, 50 мл 85%-ной H_3PO_4 и 750 мл воды кипятят 2 ч с обратным холодильником и доводят водой до литра;

реактив Фолина — Чокальтеу — 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 г Na_2MoO_4 , 700 мл воды, 50 мл H_3PO_4 , 100 мл концентрированной HCl кипятят с обратным холодильником 10 ч, затем добавляют 150 г LiSO_4 и несколько капель брома или 30%-ной H_2O_2 , снова кипятят без холодильника 15 мин, раствор охлаждают и доводят водой до литра.

Все три реактива образуют синее окрашивание в результате восстановления указанных фосфорномолибденово-вольфрамовых кислот фенолами до голубых окислов W_8O_{23} и Mo_8O_{23} .

Определение фенольных веществ в винах и винограде

Методика определения. 1 мл вина помещают в мерную колбу на 100 мл (красные вина предварительно разбавляют водой в соотношении 1:5), добавляют 1 мл реактива Фолина — Чокальтеу, 10 мл 20%-ной Na_2CO_3 , добавляют водой до метки и

раствор
Опущен
+ D₂). По
жуют на 12
Указани
плодов. Для
полот, зат
в мерную к

Определение а
Метод основ
с минеральн
ния. В вино
нов, а пост
пускация ра
нений. По р

Реактив
до рН 1,2;
нитрофенил
Методик
колбу на 2
(рН 1,2) и
роколориме

Коэф- дент проу- сания	Кон- три- анте на ме
---------------------------------	----------------------------------

99	0,0
98	0,0
97	0,0
96	0,0
95	0,0
94	0,0
93	0,0
92	0,0
91	0,0
90	0,0
89	0,0
88	0,0
87	0,0
86	0,0

Коэф- дент проу- сания	Кон- три- анте на ме
---------------------------------	----------------------------------

99	0,0
98	0,0
97	0,0
96	0,0
95	0,0
94	0,0
93	0,0
92	0,0
91	0,0
90	0,0
89	0,0
88	0,0
87	0,0
86	0,0

Коэф- дент проу- сания	Кон- три- анте на ме
---------------------------------	----------------------------------

Замеряют оптическую плотность при 500 *нм* и получают D_1 , D_2 , D_3 , D_4 . Оптическая плотность D_1 соответствует сумме оптической плотности раствора ванилина, образованного соединением ванилина с танином, и окраске самого вина; D_2 — окраске вина в кислом растворе; D_3 — окраске раствора ванилина.

Раствор в четвертой колбе используется в качестве контрольного.

Оптическая плотность исследуемого раствора $D = D_1 - (D_2 + D_3)$. По калибровочной кривой находят *мг/мл* танина, умножают на $125 \cdot 10^3$ для красных вин и на $25 \cdot 10^3$ для белых вин.

Указанный метод можно использовать для исследования плодов. Для этого навеску плодов 5 г фиксируют горячим этанолом, затем экстрагируют холодным спиртом и переносят в мерную колбу на 50 *мл* [30].

Определение антоцианов и лейкоантоцианов в винах

Метод основан на способности лейкоантоцианов при нагревании с минеральными кислотами переходить в окрашенные соединения. В вине сначала определяют окрашенные формы антоцианов, а после гидролиза лейкоантоцианов — коэффициент пропускания раствора с суммарным количеством окрашенных соединений. По разности определяют количество лейкоантоцианов.

Реактивы: 50%-ный раствор этанола, подкисленный H_2SO_4 до pH 1,2; 30%-ный раствор HCl; насыщенный раствор 2,4-динитрофенилгидразина.

Методика определения. Берут 0,5—1 *мл* вина в мерную колбу на 25 *мл*, доводят до метки подкисленным этанолом (pH 1,2) и определяют коэффициент пропускания на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром в кювете 2 *см*.

Коэффициент пропускания	Концентрация антоцианов, <i>мг/10 мл</i>	Коэффициент пропускания	Концентрация антоцианов, <i>мг/10 мл</i>	Коэффициент пропускания	Концентрация антоцианов, <i>мг/10 мл</i>	Коэффициент пропускания	Концентрация антоцианов, <i>мг/10 мл</i>
99	0,00040	85	0,00810	71	0,01810	57	0,03050
98	0,00080	84	0,00855	70	0,01940	56	0,03200
97	0,00120	83	0,00905	69	0,02030	55	0,03400
96	0,00165	82	0,00985	68	0,02100	54	0,03600
95	0,00225	81	0,01070	67	0,02210	53	0,03700
94	0,00285	80	0,01140	66	0,02320	52	0,03800
93	0,00340	79	0,01215	65	0,02455	51	0,03900
92	0,00395	78	0,02490	64	0,02490	50	0,04000
91	0,00350	77	0,01350	63	0,02580	49	0,04200
90	0,00515	76	0,01420	62	0,02700	48	0,04350
89	0,00580	75	0,01500	61	0,02810	47	0,04500
88	0,00630	74	0,01570	60	0,02850	46	0,04700
87	0,00700	73	0,01665	59	0,02900		
86	0,00740	72	0,01740	58	0,02950		

Количество антоцианов можно определить по калибровочному графику, составленному по эппидну или приведенным на стр. 19 данным, полученным экспериментальным путем.

Для перевода лейкоантоцианов в окрашенные соединения к 5 мл вина добавляют 20 мл 30%-ной HCl и 10 мл 2,4-динитрофенилгидразина (для связывания альдегидов, разрушающих антоцианы). Смесь выдерживают на кипящей водяной бане в колбе с обратным холодильником в течение 30 мин.

Полученный раствор содержит целый ряд окрашенных соединений, мешающих определению антоцианов. Для очистки используют хроматографическую колонку (длиной 170 мм и шириной 10 мм), заполненную хлопчатобумажной ватой, предварительно промытой серным эфиром, 50%-ным спиртовым раствором и водой. Колонка вставляется в колбу Бунзена, подключенную к водоструйному насосу. Раствор пропускается через колонку, промывается водой для удаления избытка 2,4-динитрофенилгидразина и других водорастворимых соединений.

Адсорбированные аглюконы элюируются 20 мл 50%-ного раствора подкисленного этанола. Элюат переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки. Содержание антоцианов определяют на фотоэлектроколориметре, как описано выше. По разности находят количество лейкоантоцианов [220].

Определение суммы катехинов в чае (ускоренный метод)

Метод основан на определенной оптической плотности окрашенных соединений катехинов чая с ванилиновым реактивом. Он позволяет быстро проводить серийные анализы, продолжительность каждого из которых 40 мин.

Реактивы: 2%-ный раствор уксусной кислоты; ванилиновый реактив (1%-ный раствор ванилина в концентрированной HCl); 80%-ный этанол.

Методика определения. 1 г измельченного черного или зеленого сухого чая помещают в колбу на 25 мл и экстрагируют 20 мл воды на кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения, доведения до метки и фильтрации 0,2 мл экстракта наносят на тонкий слой порошка целлюлозы на стеклянной пластинке 20×180 мм. Толщина слоя целлюлозы 1,5—2 мм, ширина 25—30 мм. Пластинку помещают в сосуд с 2%-ным раствором уксусной кислоты под углом 35—40° и хроматографируют в восходящем токе растворителя в течение 15—20 мин при комнатной температуре. Слой целлюлозного порошка, расположенного выше старта, осторожно снимают и элюируют катехины 80%-ным этанолом. Элюат фильтруют и доводят объем до 15 мл.

Для определения суммы катехинов к 0,5 мл элюата добавляют 2 мл ванилинового реактива и через 2 мин фотометрируют при $\lambda=490-500$ нм (сине-зеленый светофильтр) в кювете 0,5 см.

Калибровочный график для определения катехинов в чае экспериментальным путем

Оптическая плотность (D)	К
0,06	
0,07	
0,08	
0,09	
0,10	
0,11	
0,12	
0,13	
0,14	
0,15	
0,16	
0,17	
0,18	
0,19	
0,20	

Сумму катехинов

где С — концентрация катехинов в экстракте, мг/мл
3,75 — поправка на погрешность
К — катехины

Определение катехинов в чае

Метод основан на определении катехинов в чае с помощью экстракционного метода. Для этого чай экстрагируют в горячей воде, экстракт фильтруют и элюируют катехины 80%-ным этанолом. Элюат фильтруют и доводят объем до 15 мл.

Реактивы: 2%-ный раствор уксусной кислоты; ванилиновый реактив (1%-ный раствор ванилина в концентрированной HCl); 80%-ный этанол.

Методика определения. 1 г измельченного черного или зеленого сухого чая помещают в колбу на 25 мл и экстрагируют 20 мл воды на кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения, доведения до метки и фильтрации 0,2 мл экстракта наносят на тонкий слой порошка целлюлозы на стеклянной пластинке 20×180 мм. Толщина слоя целлюлозы 1,5—2 мм, ширина 25—30 мм. Пластинку помещают в сосуд с 2%-ным раствором уксусной кислоты под углом 35—40° и хроматографируют в восходящем токе растворителя в течение 15—20 мин при комнатной температуре. Слой целлюлозного порошка, расположенного выше старта, осторожно снимают и элюируют катехины 80%-ным этанолом. Элюат фильтруют и доводят объем до 15 мл.

Калибровочная кривая была построена по препарату катехинов, полученных из зеленого листа. Для расчета количества катехинов могут служить следующие данные, полученные экспериментально.

Оптическая плотность (D)	Количество катехинов, мкг	Оптическая плотность (D)	Количество катехинов, мкг	Оптическая плотность (D)	Количество катехинов, мкг
0,06	7,0	0,21	25,0	0,36	43,0
0,07	8,5	0,22	26,0	0,37	44,5
0,08	9,5	0,23	27,5	0,38	45,5
0,09	10,5	0,24	28,5	0,39	46,5
0,10	12,0	0,25	30,0	0,40	48,0
0,11	13,0	0,26	31,0	0,41	49,0
0,12	14,5	0,27	32,5	0,42	50,0
0,13	15,0	0,28	33,0	0,43	51,0
0,14	16,5	0,29	34,5	0,44	52,5
0,15	17,5	0,30	36,0	0,45	54,0
0,16	19,0	0,31	37,0	0,46	55,0
0,17	20,0	0,32	38,5	0,47	56,5
0,18	21,0	0,33	39,5	0,48	57,5
0,19	22,5	0,34	40,5	0,49	58,5
0,20	23,5	0,35	42,0	0,50	60,0

Сумму катехинов рассчитывают по формуле

$$C = 3,75K, \quad (13)$$

где C — концентрация катехинов в час, $мг/ч$ сухого чая;

3,75 — постоянная величина, рассчитанная с учетом разведения;

K — катехин, $мкг$.

Определение кофеина в чае

Метод основан на измерении оптической плотности хлороформенных экстрактов кофеина при длине волны 272 $нм$. Присутствующие в чае танины не экстрагируются хлороформом. Смолы, хлорофилл и другие сопутствующие ему пигменты не мешают определению кофеина.

Реактивы: хлороформ (чда); стандартный раствор кофеина для построения калибровочного графика — готовят растворением 100 $мг$ кофеина в 100 $мл$ хлороформа с последующим разбавлением до концентрации от 4 до 30 $мг/л$.

Методика определения. 3 $г$ сухого чая или 0,5 $г$ порошка растворимого чая либо 125 $мл$ битестерской заварки помещают в колбу, приливают 60 $мл$ хлороформа и проводят экстракцию. Полученный хлороформенный экстракт для спектрофотометрического определения кофеина разбавляют чистым хлороформом 1:10 или 1:100. Измерение оптической плотности проводят на

спектрофотометре СФ-4А в кювете 1 см при 272 нм. Содержание кофеина определяют по формуле

$$A = \frac{CPRK}{1000}, \quad (14)$$

- где A — количество кофеина в исследуемой навеске, мг;
 C — содержание кофеина в хлороформном экстракте по градуировочному графику, мг/л;
 P — степень разбавления хлороформного экстракта чистым хлороформом;
 K — количество хлороформа, используемого для экстракции кофеина из навески, мл.

Присутствие танина не искажает результата определения кофеина. Градуировочный график строится по величине оптической плотности хлороформных растворов кофеина концентрацией от 4 до 30 мг/л [207].

Определение теобромина или кофеина

Метод основан на определении оптической плотности в УФ области спектра водных экстрактов алкалоидов (теобромина и кофеина), предварительно осветленных ацетатом свинца [250]

Реактивы: основной ацетат свинца плотностью 1,23 г/мл — готовят смешиванием трех частей кристаллического ацетата свинца с одной частью окиси свинца, смесь нагревают на водяной бане с одной частью воды до образования массы белого цвета, затем приливают горячую воду до 14 частей, дают отстояться и фильтруют; бикарбонат натрия (мелко растертый в ступке); 10%-ная HCl.

Методика определения. Навеску (1 г) бобов какао, какао-порошка, шоколада или кофе вносят в плоскодонную колбу емкостью 300 мл, добавляют несколько кусочков пемзы и взвешивают. Приливают 96 мл холодной дистиллированной воды, нагревают до кипения и осторожно при перемешивании кипятят 5 мин. Колбу снимают с огня, добавляют 4 мл ацетата свинца, взбалтывают, охлаждают и взвешивают, доводя общий вес до 101 г.

Содержимое колбы перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр. Первые 10 мл отбрасывают. К 50 мл прозрачного или слегка мутного фильтрата добавляют 0,5 г NaHCO_3 для осаждения свинца. Смесь перемешивают и фильтруют, отбросив первые 10 мл фильтрата. Фильтрат помещают в кварцевую кювету 1 см и определяют оптическую плотность при λ 272 нм и 306 нм. Содержание алкалоида определяют как

$$F (\epsilon_{272}^{\text{макс}} - \epsilon_{306}^{\text{мин}}), \quad (1.5)$$

где F — фактор пропорциональности, равный отношению 1 мг чистого теобромина или кофеина в 100 мл воды к величине его оптической плотности при максимуме поглощения.

Содержимым образ

где a —

Определен

Метод поз

гидроксил

спектрофо

Коэффициент

поглощения

(K)

0,70

0,71

0,72

0,73

0,74

0,75

0,76

0,77

0,78

0,79

0,80

0,81

0,82

0,83

0,84

0,85

0,86

0,87

0,88

0,89

0,90

0,91

0,92

0,93

0,94

0,95

0,96

0,97

0,98

0,99

1,00

1,01

1,02

1,03

1,04

1,05

1,06

1,07

1,08

1,09

Содержание теобромина (кофеина) рассчитывают следующим образом:

$$\% \text{ теобромина} = \frac{F (\epsilon_{272}^{\text{макс}} - \epsilon_{306}^{\text{мин}})}{a \cdot V}, \quad (16)$$

где a — навеска образца, г;

V — объем фильтрата, взятого для разведения.

Определение миоглобина мяса методом отражения

Метод позволяет анализировать восстановленную, окисленную и гидроксилированную форму миоглобина говядины с помощью спектрофотометрии в области отражения. Пигменты определя-

Коэффициент поглощения (K)	Процент отражения	K/S	Коэффициент поглощения (K)	Процент отражения	K/S
0,70	20,0	1,600	1,10	7,94	5,337
0,71	19,5	1,662	1,11	7,76	5,483
0,72	19,1	1,713	1,12	7,59	5,626
0,73	18,6	1,781	1,13	7,41	5,785
0,74	18,2	1,838	1,14	7,24	5,942
0,75	17,8	1,898	1,15	7,08	6,098
0,76	17,4	1,961	1,16	6,92	6,260
0,77	17,0	2,026	1,17	6,76	6,431
0,78	16,6	2,095	1,18	6,61	6,598
0,79	16,2	2,167	1,19	6,46	6,773
0,80	15,8	2,244	1,20	6,31	6,966
0,81	15,5	2,303	1,21	6,17	7,135
0,82	15,1	2,387	1,22	6,03	7,322
0,83	14,8	2,452	1,23	5,89	7,519
0,84	14,5	2,521	1,24	5,75	7,725
0,85	14,1	2,617	1,25	5,62	7,926
0,86	13,8	2,692	1,26	5,50	8,120
0,87	13,5	2,771	1,27	5,37	8,340
0,88	13,2	2,854	1,28	5,25	8,550
0,89	12,9	2,940	1,29	5,13	8,770
0,90	12,6	3,031	1,30	5,01	9,000
0,91	12,3	3,127	1,31	4,90	9,230
0,92	12,0	3,227	1,32	4,79	9,460
0,93	11,7	3,332	1,33	4,68	9,710
0,94	11,5	3,405	1,34	4,57	9,960
0,95	11,2	3,520	1,35	4,47	10,210
0,96	11,0	3,600	1,36	4,37	10,470
0,97	10,7	3,726	1,37	4,27	10,730
0,98	10,5	3,814	1,38	4,17	11,020
0,99	10,2	3,953	1,39	4,07	11,310
1,00	10,0	4,050	1,40	3,98	11,580
1,01	9,77	4,167	1,41	3,89	11,870
1,02	9,55	4,284	1,42	3,80	12,180
1,03	9,33	4,406	1,43	3,72	12,460
1,04	9,12	4,528	1,44	3,63	12,800
1,05	8,91	4,656	1,45	3,55	13,110
1,06	8,71	4,785	1,46	3,47	13,430
1,07	8,51	4,918	1,47	3,39	13,760
1,08	8,32	5,052	1,48	3,31	14,120
1,09	8,13	5,191	1,49	3,24	14,450

ются непосредственно в образце мяса без предварительной экстракции, что позволяет сохранить соотношение пигментных производных.

Показания прибора (СФ-10, СФ-17) снимаются по поглощению монохроматического пучка света и проценту отражения. По этим показателям рассчитывают коэффициенты поглощения (K) и рассеивания (S). Относительные количества пигментов мяса можно определить из отношения K/S при соответствующих длинах волн:

λ 525 нм — максимум поглощения для всех трех пигментов;

λ 572 нм — максимум поглощения для восстановленного оксимиоглобина;

λ 474 нм — максимум поглощения для окси- и метмиоглобина.

Относительное количество метмиоглобина определяют по формуле $K/S_{572} : K/S_{525}$, а восстановленного миоглобина — по формуле $K/S_{474} : K/S_{525}$.

На стр. 23 приведены величины K/S , соответствующие полученным значениям поглощения или проценту отражения. Данные получены после обработки экспериментальных результатов на ЭВМ.

2.2. ИСТОЧНИКИ ОШИБОК СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА

При всех измерениях неизбежно допускаются некоторые ошибки (погрешности). Ошибкой измерения истинной величины X_0 называется разность результатов измерений X_i и истинного значения, т. е.

$$\delta_i = X_i - X_0, \quad (17)$$

где X_i может иметь различные значения: X_1, X_2, \dots, X_n .

Отношение ошибки измерения к истинному значению измеряемой величины называется относительной ошибкой измерения:

$$\Delta = \frac{\delta_i}{X_0} \text{ или } \Delta = \frac{\delta_i}{X_0} 100 (\%); \quad (18)$$

Различают две основные группы ошибок: систематические ошибки и случайные ошибки. При такой классификации не учитываются грубые ошибки, вызываемые промахами и допускаемые в результате небрежности или неумения работать с прибором.

Систематические ошибки появляются, как правило, при повторных измерениях. Они вызываются либо неисправностью

измерительных приборов, либо неточностью метода измерений. Так, при смещении первоначального положения стрелки прибора относительно нуля получится систематическая ошибка, учесть которую можно только внесением соответствующей поправки. Для этого необходимо сравнить показания неисправного прибора с показаниями заведомо правильного.

Систематические ошибки, вызванные неточностью метода измерений, обнаруживаются и вычисляются в результате тщательного анализа метода и математических формул, по которым определяется искомая величина. Величина систематической ошибки всегда имеет определенный знак, т. е. односторонне влияет на результаты измерений.

Случайные ошибки возникают вследствие самых различных как субъективных, так и объективных причин: изменения напряжения в сети или температуры в процессе измерений, неудобного расположения прибора, плохого освещения шкалы измерений, состояния работающего и т. п. Например, из-за колебаний частоты переменного тока, питающего прибор, при электрических измерениях часто появляется так называемый «дрейф нуля» прибора.

Вследствие различного характера причин происхождения случайные ошибки могут иметь различный знак, т. е. они могут как увеличивать, так и уменьшать значение измеряемой величины.

Ошибки такого типа подчиняются законам теории вероятностей, установленным для случайных явлений. Однако выводы теории случайных ошибок справедливы только при большом числе тщательно проведенных измерений. На практике часто ограничиваются 5—10 измерениями, хотя в каждом конкретном случае необходимое число измерений может быть установлено с помощью указанной теории.

Ниже рассматриваются основные положения теории ошибок применительно к спектральным измерениям величины оптической плотности.

Для нахождения ошибки метода измерений необходимо, пользуясь известной формулой, найти вспомогательную формулу для величин абсолютной и относительной ошибок. Затем в эту последнюю формулу следует подставить вместо значений измеряемых величин их приблизительные значения. Такое определение ошибки метода измерений до начала самих измерений помогает экспериментатору подобрать для работы приборы, обеспечивающие необходимую ему точность, а также выбрать необходимые для получения заданной точности диапазоны измерений.

Пример. При проведении спектрофотометрических измерений ошибка метода может быть вызвана как ошибками показаний прибора, так и ошибками результатов измерений по калибровочному графику. Согласно закону Бера для фотометриче-

ской системы зависимость можно выразить следующим образом:

$$\frac{D}{l} = aC + b, \quad (19)$$

где D — оптическая плотность раствора сравнения;
 l — толщина оптического пути луча в кювете прибора;
 a — наклон калибровочного графика $\frac{D}{l} = f(C)$;
 C — концентрация светопоглощающего вещества в растворе;
 b — отрезок, отсекаемый на оси D/l .

Для получения выражения, характеризующего максимальную возможную ошибку определения концентрации, изобразим уравнение 19 в таком виде:

$$C = \frac{D/l - b}{a} \quad (20)$$

и найдем формулу для определения абсолютной ошибки.

Сначала находим полный дифференциал функции:

$$dC = \frac{\delta C}{\delta D} dD + \frac{\delta C}{\delta l} dl + \frac{\delta C}{\delta b} db + \frac{\delta C}{\delta a} da \quad (21)$$

и продифференцируем формулу 20:

$$dC = \frac{1}{a} dD - \frac{D}{al^2} dl - \frac{1}{a} db - \frac{D(l-b)}{a^2} da. \quad (22)$$

Величины dC , dD , dl , db и da можно заменить конечными разностями или стандартными отклонениями $\pm S_C$, $\pm S_D$, $\pm S_l$, $\pm S_b$, $\pm S_a$. Поскольку задача состоит в определении максимальной ошибки, в выражении 22 все знаки заменяются на «плюс», т. е.

$$S_C = \frac{1}{a} S_D + \frac{D}{al^2} S_l + \frac{1}{a} S_b + \frac{D(l-b)}{a^2} S_a. \quad (23)$$

Величина относительной ошибки находится по формуле

$$\Delta_C = \frac{S_C}{C} 100 = \left(\frac{S_D}{D-b} + \frac{S_l}{l - \frac{bl^2}{D}} + \frac{S_b \cdot l}{D - b \cdot l} + \frac{S_a}{a} \right) 100. \quad (24)$$

Формула 24 получена путем деления правой части выражения 23 на величину C , определяемую по уравнению 20.

Теперь нужно решить, какие значения стандартных отклонений и измеряемых величин необходимо подставить в формулу 24. Анализ показывает, что на точность определений концентрации данным методом большое влияние оказывает относительная ошибка измерения S_D — показания прибора по шкале оптических плотностей и выбор толщины оптического пути поглощения световых лучей в кюветах. Величины S_D , S_l определяются из 6—10 параллельных измерений пропускания какого-либо стандартного раствора по сравнению с выбранным раство-

ром при повторных наполнениях кювет. Величины S_a и S_b могут быть определены методом наименьших квадратов с большой точностью при построении калибровочных графиков.

Сравнение слагаемых в выражении для Δc показывает, что основная часть погрешности данного метода вызвана неточностью определения величины пропускания D . В связи с этим разработаны методы спектрофотометрических измерений (в частности, дифференциальная спектрофотометрия), сводящие к минимуму ошибку определения пропускания.

Теория случайных ошибок дает возможность не только оценить погрешность принятого метода измерений, но и установить закономерности распределения ошибок, доверительный интервал и другие статистические характеристики, имеющие важное значение при использовании информации об измеряемой величине.

2.3. ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Инфракрасная (ИК) спектроскопия представляет собой один из новейших физических методов количественного и качественного анализа пищевых продуктов. Этот метод позволяет получить достаточно полную информацию о строении и составе органических веществ. ИК-излучение применяется для исследования жирнокислотного состава молочных продуктов, широко используется для определения пестицидов в различных пищевых продуктах, при анализе пищевых красителей, а также для контроля технологических процессов при переработке растительного и животного сырья.

Применение ИК-спектроскопии чаще оказывается более полезным в качестве дополнительного метода при проведении идентификации чистых веществ после хроматографического разделения сложных компонентов пищевых продуктов. Инфракрасный спектр органического соединения является одним из наиболее однозначных физических свойств вещества. ИК-спектр более точно характеризует вещество, чем температура плавления, показатель преломления или плотность. При этом совсем не обязательно иметь образец известного соединения для сравнения с определенным, а достаточно сопоставить полученный спектр с опубликованными кривыми поглощения. Однако для идентификации вещества необходимо знать, к какому классу органических соединений относится определяемое вещество.

Область инфракрасного излучения расположена после видимой части спектра и разделяется на ближнюю с диапазоном $0,8\text{--}2,5\text{ мкм}$ ($1\text{ мкм} = 10^{-6}\text{ м}$), что соответствует волновым числам $12\,500\text{--}4\,000\text{ см}^{-1}$ (волновое число ν показывает, сколько раз длина волны укладывается в 1 см), среднюю ($2,5\text{--}25\text{ мкм}$) и дальнюю (более 25 мкм).

В табл. 2 представлены диапазоны длины волн и волновые числа для ультрафиолетовой, видимой и инфракрасных областей спектра.

Области излучений в спектральном анализе

Таблица 2

Ультрафиолетовая область	Видимая область	Инфракрасная область		
		ближняя	средняя	дальняя
0,2—0,4	0,8	2,5	2,5	200 (длина волн, мкм)
50 000—25 000	12 500	4000	400	50 (волновое число, см ⁻¹)

Для всех областей поглощения света большей длины волны соответствует большая энергия. Инфракрасная спектроскопия также основана на поглощении излучения. Спектр поглощения тесно связан со строением исследуемого вещества. Молекулу вещества можно рассматривать как систему соответствующих атомов, которые находятся в строго определенном энергетическом состоянии. Из всего спектра, падающего на молекулу излучения, она поглощает волны только той длины, которые могут изменить ее энергетическое состояние. Энергия, полученная молекулой, может быть потрачена на изменение электронного состояния атомов (при этом спектр будет относиться к ультрафиолетовой и видимой областям) или на изменение колебательной и вращательной энергии. Колебательная энергия молекул определяется двумя основными типами колебаний: валентными, при которых расстояние между двумя атомами уменьшается или увеличивается, но атомы остаются на оси валентной связи, и деформационными, при которых атомы отходят от оси валентной связи. Энергия деформационных колебаний значительно меньше энергии валентных колебаний, поэтому деформационные колебания наблюдаются при волнах большей длины, чем валентные.

Установлено, что прочность отдельных связей влияет на частоту валентных колебаний. Тройные связи (поглощение при 4,4—5,0 мкм, 2300—2000 см⁻¹) прочнее двойных (поглощение при 5,3—6,7 мкм, 1900—1500 см⁻¹), которые, в свою очередь, прочнее одинарных связей С—С, С—N, С—О, поглощающих при 7,7—12,5 мкм, 1300—800 см⁻¹.

Согласно теории молекулярных колебаний молекула, построенная из n атомов, имеет $3n - 6$ нормальных колебаний; для линейных молекул $3n - 5$. При этом количество валентных колебаний $n - 1$, а деформационных $2n - 5$ ($2n - 4$ для линейных молекул).

В многоатомных молекулах, кроме нормальных колебаний (валентных и деформационных), в спектре могут наблюдаться

дополнительные полосы, имеющие меньшую интенсивность. Число возможных типов колебаний большой асимметричной молекулы настолько велико, что даже полная математическая обработка зависимости формы колебаний от молекулярной структуры не дает верного представления о строении молекулы. Поэтому для расшифровки ИК-спектра необходимо иметь информацию о частоте и интенсивности поглощения чистых соединений известного строения.

Колебания отдельных функциональных групп вызывают поглощение в строго определенных областях инфракрасного спектра. В спектрах поглощения различных молекул, содержащих такие группы атомов или связи, будет присутствовать несколько одинаковых полос, частоты поглощения которых называются характеристическими. Наличие таких характеристических полос позволяет определить по спектру присутствие в молекуле различных групп и установить ее строение.

Обнаружение характеристических частот составляет основу инфракрасной спектроскопии. В настоящее время имеется целый ряд таблиц характеристических частот и диаграмм с расположением главных полос по волновым числам и длинам волн. Примером таких химических групп, имеющих характеристические полосы независимо от того, каким молекулам эти группы принадлежат, являются валентные колебания связей $C-H$, $C=O$, $C=C$, $O-H$ и деформационные колебания $C-H$, $N-H$, NO_2 , CHO , $CONH_2$.

Основным условием проявления характеристических частот является существенное отличие параметров колебаний групп от параметров колебаний основного скелета молекулы. Для скелета органических молекул, состоящего из связей $C-C$, колебания лежат в области $800-1200\text{ см}^{-1}$. Частота всех видов колебаний весьма чувствительна к изменениям в строении молекул. Этим объясняется высокая специфичность инфракрасного спектра любого органического соединения [2, 52].

При выполнении аналитических работ по качественному или количественному исследованию пищевых продуктов определяется изменение величины оптической плотности D или пропускания T в максимуме полосы поглощения. Для автоматической записи спектра применяются специальные спектрометры и спектрофотометры.

2.3.1. ПОЛУЧЕНИЕ ИНФРАКРАСНЫХ СПЕКТРОВ И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Инфракрасный спектр веществ в значительной степени зависит от физического состояния исследуемого образца, от концентрации соединений. Получению правильных результатов мешают рассеивание света, межмолекулярное взаимодействие, поляризуемость окружающей среды и другие факторы.

Сложные органические вещества можно изучать в виде тонкого слоя чистых жидкостей, в виде твердых пленок после охлаждения между пластинками расплавленного продукта, в виде пасты при растирании навески с жидкостью, которая уменьшает отражение и рассеивание света, в виде спрессованных таблеток в смеси с бромистым калием или другим галогенидом щелочного металла.

Твердые продукты расплавляют, готовят в виде суспензии или таблеток. Широко пользуются приемом, когда 5 мг вещества растирают с 1—2 каплями какого-либо масла и образовавшуюся пасту помещают между двумя пластинками хлористого натрия.

Обычно для приготовления пасты используют смесь жидких высокомолекулярных парафиновых углеводородов, называемых вазелиновым маслом (нуйолом). Нуйол имеет поглощение для валентных колебаний (C—H) при длине волны 3,3—3,5 мкм ($3030\text{—}2860\text{ см}^{-1}$), а деформационных колебаний — в диапазоне около 6,85 мкм и 7,28 мкм (1460 см^{-1} , 1374 см^{-1}).

Вместо нуйола рекомендуется применять гексахлорбутадиен, прозрачный в областях поглощения масла. Жидкие масла можно исследовать, помещая каплю на пластинку хлористого натрия (пластинка вырезается из кристалла диаметром около 25 мм и толщиной 5 мм), которую плотно прижимают к другой такой же пластинке.

Распространенным методом приготовления твердых проб является прессование пробы с наполнителем в виде таблеток.

Часто приходится снимать спектр вещества, находящегося в растворе. Вода в качестве растворителя используется очень редко, ввиду того что имеет интенсивные полосы поглощения в ряде областей спектра. Удобными для спектральных целей растворителями являются четыреххлористый углерод, сероуглерод и хлороформ. CCl_4 исключает область 11,9—14,3 мкм ($834\text{—}700\text{ см}^{-1}$), а CS_2 6—7,4 мкм ($1600\text{—}1400\text{ см}^{-1}$). Таким образом, снимая спектр раствора вещества в четыреххлористом углероде, а потом в сероуглероде, можно получить полный спектр вещества в растворе. Хлороформ имеет больше полос поглощения. Бензол и гексан еще сильнее поглощают излучение и в ближней инфракрасной области, и в средней [83].

2.3.2. РАСШИФРОВКА ИК-СПЕКТРОВ

При изучении инфракрасных спектров органических соединений были выделены две характерные области: область $800\text{—}1400\text{ см}^{-1}$ и область за пределами $800\text{—}1400\text{ см}^{-1}$.

В области $800\text{—}1400\text{ см}^{-1}$ проявляются валентные связи C—C, C—N, N—O, C—O и деформационные связи N—H, O—H, C—H. В этой области даже небольшие изменения в строении молекул вызывают существенное изменение спектра.

В области за пределом $800\text{--}1400\text{ см}^{-1}$ спектры органических соединений имеют интенсивные полосы, соответствующие отдельным связям или группам атомов (характеристические). Частоты колебаний таких групп почти не зависят от состава молекул, в которые они входят. Именно эта область проявления колебательных спектров наиболее часто используется при исследовании пищевых продуктов.

Идентификация соединения путем сравнения его спектра со спектром известного вещества возможна, если имеются подробные сведения о его спектре. В связи с этим остановимся на характеристике полос ИК-спектра для основных групп органических соединений.

Все органические вещества имеют связи C—C , C—H . Углеводороды содержат только эти элементы, и их колебательные спектры обусловлены в основном валентными и деформационными связями C—C , C—H .

Все полосы, связанные с валентными колебаниями C—H , приходятся на область $3200\text{--}2750\text{ см}^{-1}$ ($3,1\text{--}3,6\text{ мкм}$). Частота 2962 см^{-1} предельных углеводородов соответствует асимметричному колебанию метиленовой группы, а частота 2853 см^{-1} относится к симметричному валентному колебанию метиленовой группы.

Полосы, соответствующие этиленовым связям $=\text{C—H}$ и ацетиленовым $\equiv\text{C—H}$, сдвинуты в сторону более высоких частот (соответственно $3000\text{--}3100\text{ см}^{-1}$ и $3280\text{--}3340\text{ см}^{-1}$).

Полоса валентных колебаний производных ацетилена вблизи 3310 см^{-1} легко обнаруживается, в этой области, помимо нее, может наблюдаться поглощение только NH -группы. Природные ацетиленовые соединения подробно исследовались в ультрафиолетовой области спектра, однако структура соединений этого класса была установлена с помощью ИК-спектроскопии.

Частота поглощения этиленового ряда весьма чувствительна к окружению ненасыщенного центра. К тому же в области $3000\text{--}3100\text{ см}^{-1}$ имеется целый ряд полос поглощения эпоксидных и циклопропильных соединений. Присутствие метоксильных и альдегидных групп сдвигает полосу поглощения в сторону низких частот.

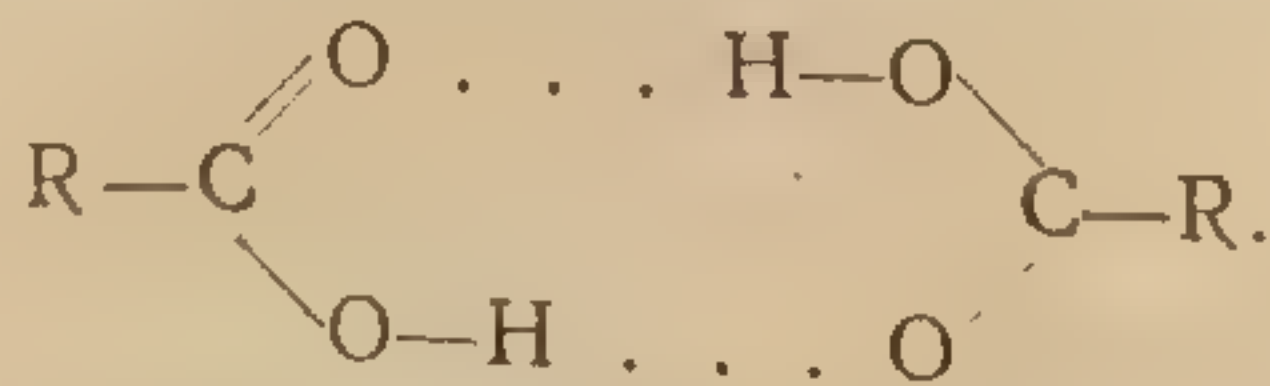
Полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям C—C , находятся в области $1150\text{--}850\text{ см}^{-1}$ ($8,7\text{--}11,76\text{ мкм}$) и мало интенсивны. Деформационные колебания этой группы наблюдаются в области частот ниже 500 см^{-1} и на инфракрасных спектрах не исследуются.

Введение в молекулу органического соединения кислорода (OH , C=O , $\text{C}\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \diagup \diagdown \\ \text{H} \end{smallmatrix}$, C—O—C) вызывает появление в ИК-спектрах интенсивного поглощения. Присутствие гидроксильных групп (свободные гидроксильные группы) вызывает появление узкой полосы в области $3630\text{--}3610\text{ см}^{-1}$ ($2,74\text{--}2,79\text{ мкм}$), сво-

В колебательных спектрах водородная связь проявляется очень ярко и своеобразно. Анализ смесей спиртов осуществляется в области 8—13 мкм.

Известно, что введение в карбонильную группу двойной связи снижает частоту валентных колебаний $C=O$ для всех типов связей на $20-30\text{ см}^{-1}$. Наличие гидроксильной группы у карбонильной (для кислот) не вызывает существенных изменений частоты валентных колебаний $C=O$ по сравнению с альдегидами.

При исследовании ИК-спектра карбоновых кислот следует иметь в виду способность последних образовывать димеры с прочными водородными связями между карбонильной и гидроксильной группами, что существенно снижает частоту поглощения:



При сильном разбавлении появляются две полосы поглощения, одна из них соответствует мономеру — 1761 см^{-1} ($5,68\text{ мкм}$), а другая димеру — 1718 см^{-1} ($5,82\text{ мкм}$). В сильно разбавленном растворе появляется полоса поглощения, характерная для свободных гидроксильных групп при 3570 см^{-1} ($2,8\text{ мкм}$), в то время как для связанных (у димеров) — при $2700\text{—}2500\text{ см}^{-1}$ ($3,7\text{—}4,0\text{ мкм}$).

Строение углеводородного радикала не влияет на частоту валентных колебаний $C=O$ карбонильных соединений одного типа. Исключением являются случаи, когда карбонильная группа включена в напряженный цикл. Так, у циклобутанов частота колебания находится вблизи 1775 см^{-1} ($5,73\text{ мкм}$).

Аналогичное явление наблюдается в спектре сложных эфиров. Для эфиров насыщенных кислот (предельные алифатические эфиры) интенсивная полоса появляется при $1750\text{—}1735\text{ см}^{-1}$ ($5,71\text{—}5,76\text{ мкм}$), а для непредельных и ароматических сложных эфиров интенсивная полоса появляется при $1730\text{—}1715\text{ см}^{-1}$ ($5,78\text{—}5,83\text{ мкм}$).

Хиноны с двумя группами CO в одном цикле имеют полосы поглощения с частотой $1690\text{—}1655\text{ см}^{-1}$ ($5,92\text{—}6,04\text{ мкм}$), в разных циклах — $1655\text{—}1635\text{ см}^{-1}$ ($6,04\text{—}6,12\text{ мкм}$).

Подробно изучено влияние атома галоида на поглощение полосы $C=O$ карбонильных соединений. Присоединение галоида к α -углеродному атому повышает частоту валентных колебаний. Так, α -галоидзамещенные кетоны имеют ν $1745\text{—}1725\text{ см}^{-1}$, эфиры галоидзамещенных карбоновых кислот — $1770\text{—}1745\text{ см}^{-1}$. В молекулах, где атом галоида присоединяется к карбонильной группе (галоидангидриды кислот), наблюдается более высокое значение частоты — до $1815\text{—}1785\text{ см}^{-1}$ ($5,51\text{—}5,60\text{ мкм}$).

В спектрах ангидридов карбоновых кислот имеются две полосы поглощения (например, уксусный ангидрид — 1832 и 1761 см^{-1} , или $5,46$ и $5,68\text{ мкм}$), полоса с большим волновым числом — интенсивнее.

Подробно изучено влияние аминогруппы в карбоновых кислотах. Амиды кислот, у которых аминогруппа находится непосредственно у карбонильной, имеют полосы поглощения для первичных амидов в диапазоне $3180\text{—}3540\text{ см}^{-1}$ ($3,15\text{—}2,83\text{ мкм}$), вторичные амиды — соответственно $1570\text{—}1515\text{ см}^{-1}$ ($6,37\text{—}6,60\text{ мкм}$) и $1550\text{—}1510\text{ см}^{-1}$ ($6,45\text{—}6,62\text{ мкм}$).

Первичные амины имеют две основные полосы поглощения при 3500 и 3400 см^{-1} ($2,86\text{—}2,94\text{ мкм}$), обусловленные асимметричными и симметричными колебаниями NH_2 -группы. Вторичные амины характеризуются одной полосой в той же области спектра, что и первичные.

Аминокислоты дают интенсивную полосу поглощения для валентных колебаний $C=O$ в диапазоне $1600\text{—}1560\text{ см}^{-1}$ ($6,25\text{—}6,41\text{ мкм}$), для группы NH_2 — в диапазоне $3130\text{—}3030\text{ см}^{-1}$ ($3,20\text{—}3,30\text{ мкм}$). Соли аминокислот для NH_2 -группы в диапазоне $3400\text{—}3200\text{ см}^{-1}$ ($2,94\text{—}3,13\text{ мкм}$), для CO_2 -группы — $1600\text{—}1560\text{ см}^{-1}$ ($6,25\text{—}6,41\text{ мкм}$). Хлористоводородные соли аминокислот интенсивно поглощают по валентным колебаниям $C=O$ в диапазоне $1730\text{—}1700\text{ см}^{-1}$ ($5,78\text{—}5,88\text{ мкм}$).

Частоты валентных колебаний $C-N$ находятся в области частот валентных колебаний скелетных $C-C$ -групп и значи-

тельно усложняют спектр органического соединения и его идентификацию.

Среди прочих органических соединений наиболее изучены спектры соединений серы и фосфора. Для серосодержащих соединений идентифицированы полосы S—H, C—S, S—S, S=O-групп. Валентные колебания S—H-группы находятся в области 2590—2550 см^{-1} (3,86—3,92 $\mu\text{м}$), C—S-группы — в интервале 705—570 см^{-1} (14,18—17,54 $\mu\text{м}$), S—S-группы — в диапазоне 550—450 см^{-1} .

При исследовании пищевых продуктов методом ИК-спектроскопии руководствуются справочниками с указанием основных аналитических линий поглощения функциональных групп.

Метод ИК-спектроскопии используется для определения содержания в пищевых продуктах витаминов А, К, К₁, К₂, В₁, В₂, В₆, С, никотиновой кислоты, токоферолов и каротина [89, 2]. В комбинации с хроматографией ИК-спектроскопию можно применить для исследования ароматических веществ и ряда органических соединений.

2.4. АТОМНО-АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

2.4.1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АТОМНОЙ АБСОРБЦИИ

Расширение познаний в области физиологической роли минеральных элементов, их каталитического воздействия на ферментативные процессы выдвигает насущную потребность в разработке и применении аналитических методов количественного определения отдельных минеральных элементов, включая и микроэлементы.

Многие химические методы не представляют интереса, так как они оперируют слишком большими навесками и требуют большой затраты времени. Фотоколориметрические методы и комплексометрия также не соответствуют требованиям по чувствительности, точности и скорости выполнения анализов.

Наиболее полно этим требованиям отвечают спектральные методы. В изучение растительных и животных продуктов начинается проникать эмиссионный спектральный анализ, основанный на спектре излучения, люминесцентный анализ по спектру испускания и абсорбционный анализ по спектру поглощения. Из этих трех видов анализов в последние годы наибольшее развитие у нас и за рубежом приобрел метод атомно-абсорбционной спектроскопии, развитие которого тесно связано со всей историей спектроскопии. Успехи квантовой теории, в частности квантовой теории излучения Эйнштейна, позволили установить физический смысл и связь излучательных и поглочительных процессов, происходящих в атомных системах.

Согласно квантовой теории излучения между стационарными уровнями i и k с энергией E_i и E_k (когда $E_k > E_i$) наблюдаются переходы трех видов:

излучательные переходы ($k \rightarrow i$) с возбужденного уровня в более низкое энергетическое состояние, происходящие спонтанно;

поглотительные переходы ($i \rightarrow k$) от низкого к более высокому энергетическому состоянию, происходящие вынужденно под воздействием внешнего излучателя с частотой ν_{ki} ;

излучательные переходы ($k \rightarrow i$), происходящие вынужденно (индуцированно) при воздействии той же частоты излучения, что и частота испускания.

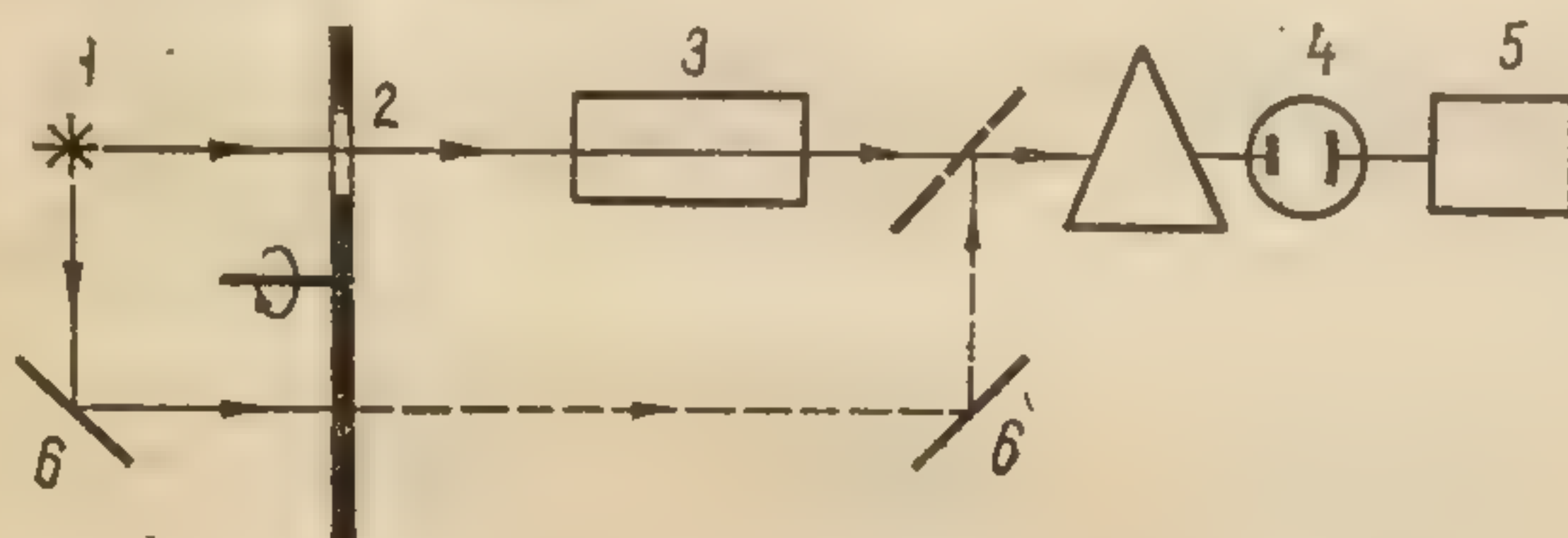


Рис. 2. Схема двухлучевого атомно-абсорбционного спектрофотометра:

1 — источник света; 2 — диск прерывателя; 3 — пламя; 4 — фотоэлектрический приемник света; 5 — электронная схема регистрации; б — зеркало

Долгие годы в аналитической химии (атомная эмиссионная спектроскопия) использовали только спонтанный излучательный переход.

В атомно-абсорбционной спектроскопии стал применяться поглотительный процесс, при котором поглощение энергии атомом происходит на основном уровне. В 1955 г. Уолш предложил рациональный способ регистрации атомной абсорбции и рекомендовал схему установки для проведения анализов. Такая простая схема представлена на рис. 2.

Анализируемый раствор вводится с помощью распылителя в пламя горелки в виде аэрозоля. Измеряется не излучение элемента в пламени, как при пламенной фотометрии, а поглощение атомами излучения от стандартного источника света. Для этого поглощающий слой паров просвечивают монохроматическим пучком света с длиной волны, соответствующей линии поглощения исследуемого элемента. В пламени проба образует атомные пары. Атомы определяемого элемента поглощают падающее излучение в отношении, прямо пропорциональном его концентрации.

В качестве источника света были предложены газоразрядные лампы низкого давления, которые дают достаточно тонкую

резонансную линию определяемого элемента. Спектральная часть имеет призму и дифракционную решетку для селекции той длины волны, которая поглощается измеряемым элементом. Световой сигнал поступает на фотоумножитель, усиливается и подается на гальванометр.

Сигнал от спектрофотометра попадает на автоматическое считывающее устройство, которое выдает результат в единицах поглощения или оптической плотности на цифровой визуальный регистратор концентраций. Сигнал также может быть принят любым 10-милливольтным записывающим потенциометром.

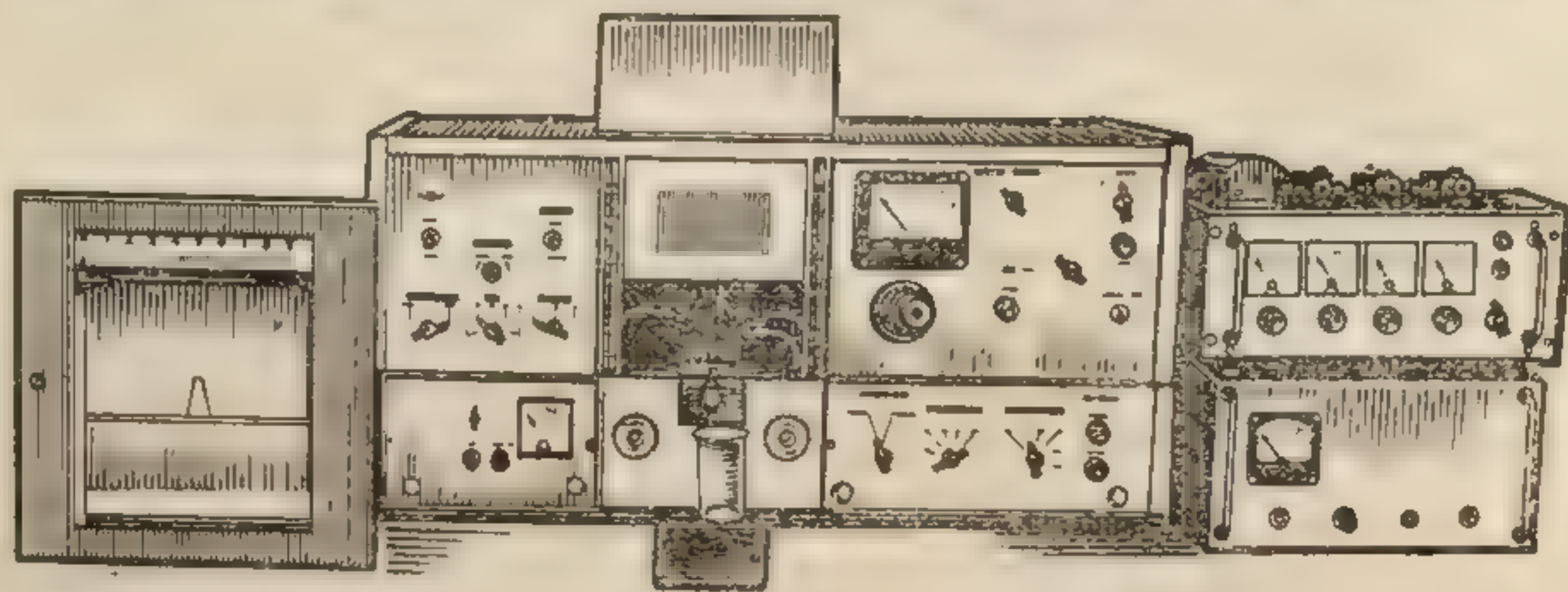


Рис. 3. Атомно-абсорбционный спектрофотометр «Сатурн»

Основным достоинством метода атомно-абсорбционной спектроскопии является то, что в пламени получается более простой спектр определяемого элемента с выраженной резонансной линией, чем в дуге или при искровом разряде в эмиссионной спектроскопии. Это исключает наложение резонансных линий различных элементов и значительно уменьшает взаимное влияние компонентов исследуемого продукта. Кроме того, при абсорбционном анализе значительно снижается влияние условий анализа, в частности температуры пламени, колебания которой незначительно влияют на атомы, находящиеся в невозбужденном состоянии.

Эта независимость от изменения температуры среды является одной из самых важных особенностей атомной абсорбции.

Однако применение атомно-абсорбционной спектроскопии ограничивается, например, невозможностью определения прямым путем элементов, резонансная линия которых лежит в вакуумной ультрафиолетовой области спектра (менее 200 нм). Такими элементами являются галогенины, углерод, фосфор, сера. К недостаткам метода относится и необходимость для многих приборов последовательного измерения концентрации элементов со сменой источника света. Несмотря на эти недостатки, метод атомно-абсорбционной спектроскопии на настоящем уровне является наиболее приемлемым для исследования биологических объектов (пищевых продуктов).

Указанные основные преимущества, а также простота и быстрота выполнения анализов способствовали широкому использованию этого метода. Крупные оптические фирмы развитых стран наладили производство аппаратуры.

Атомно-абсорбционные спектрофотометры выпускаются следующими фирмами: в Японии — Hitachi, Shimadzu; в Австрии — Varian Techtron; в Англии — Unicam, Precision-Hilger; в США — Perkin-Elmer, Berman.

Конструкция приборов различна, но большинство выпускаемых моделей работает с двойным лучом, когда свет от полого катода лампы пропускается и через пламя с образцом, и по сравнительному пути, не соприкасаясь с образцом. Двухлучевая система сокращает до минимума влияние колебаний мощности лампы, чувствительности детектора фотоумножителя, оптической и электронной систем. Для работы на таких приборах можно использовать различные источники света [189].

Отечественная приборостроительная промышленность серийно выпускает атомно-абсорбционный спектрофотометр «Сатурн» (рис. 3).

2.4.2. ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АНАЛИЗА

Озоление образцов

Для анализа большинства пищевых продуктов приходится проводить их предварительное озоление сухим или мокрым способом. Каждый из способов имеет свои преимущества и недостатки. При мокром озолении все металлы без потерь переводят в раствор, однако для пищевых продуктов, содержащих большое количество органических веществ и имеющих незначительную зольность, приходится брать достаточно большую навеску 10—20 г. Расход кислоты для обугливания оказывается достаточным, чтобы внести в анализируемый раствор дополнительное количество минеральных элементов, а это влияет на количественные результаты.

Поэтому для многих пищевых продуктов лучше применять осторожное сухое озоление. Хорошие результаты дает применение для предварительного обугливания инфракрасной лампы мощностью 250 или 500 Вт. Озоление проводят при температуре муфеля 450—550°С до постоянной массы (веса). Остаток растворяют в 1—2 мл соляной кислоты, добавляют 3—5 мл дважды дистиллированной воды и нагревают до растворения. Раствор переносят в колбу емкостью 50 мл и дополняют водой до метки. При температуре озоления не выше 550°С сохраняются следующие элементы: натрий, калий, кальций, магний, железо, цинк, медь, кобальт, марганец и олово. В незначительных количествах происходят потери таких элементов, как свинец, серебро и мышьяк.

При неполном обугливании медь и железо адсорбируются углеродом и полностью не экстрагируются. Если зола имеет кислую реакцию и продукт богат фосфорными соединениями, то осадок растворяют в соляной кислоте, отфильтровывают и остаток дополнительно обугливают. Щелочная зола может взаимодействовать с керамикой тигля и образовывать нерастворимые кремнистые соединения. Поэтому для озоления пищевых продуктов лучше использовать платиновые или кварцевые тигли. При исследовании минерального состава животных жиров сухое озоление приводит к значительным потерям меди и железа.

Мокрое озоление обычно проводят смесью концентрированных азотной и серной кислот. К навеске продукта 10 г добавляют 30 мл азотной кислоты, а по окончании реакции 10 мл серной и нагревают до обугливания. Затем добавляют еще 5 мл азотной кислоты и кипятят до полного разложения. В охлажденный раствор приливают 10—20 мл воды и нагревают до полного удаления окислов азота.

Экстракция микроэлементов органическими растворителями

Из растительных и некоторых животных продуктов минеральные элементы можно экстрагировать 0,1 М раствором ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты) или ее динатриевой солью (трилон Б, комплексон Ш). Хорошо экстрагируются кальций, магний, калий, марганец, медь и цинк. Железо полностью не экстрагируется. Этот метод позволяет определить указанные элементы в присутствии фосфорной кислоты и кремния. В растительных продуктах (навеска 0,25 г сухого вещества и 20 мл ЭДТА) можно определить кальций, магний, калий и цинк с такой же точностью, что и при сухом озолении.

Большинство металлов (за исключением щелочных) образуют с пирролидиндитиокарбоматом аммония (ПДКА) хелатные соединения, которые хорошо экстрагируются метилизобутилкетон (МИБК). Полученный раствор можно применять для непосредственного измерения концентрации металла. Определение примесей металлов в поваренной соли и концентрированных рассолах проводят с предварительной экстракцией их соответствующими хелатами. ПДКА используется для экстракции кальция, магния, железа, цинка, кобальта и меди.

Известно, что органические растворители повышают чувствительность атомно-абсорбционного метода по сравнению с водными растворами. Поэтому эталонные растворы для построения калибровочных графиков должны готовиться на используемых органических растворителях. Органические растворители можно применять для повышения концентрации микроэлементов, если их концентрация оказывается ниже оптимальной.

Имеется
тельных мас
масла в ме
Этим методе
на содержа
магния.

Из молока
ется экстра
вобожженной
экстракции
шийся водно
анализа на

Однако
затрудняет
применения
в этой обла
экстракции
тракта. По э
бирку с при
ной воды, 4
вают 15—20
порциями п
выпаривают
печи при те
ние щелочн
ременной ва

При под
определить
концентрац
мальной ко
по каждом
доля в объ
рацию элем
ние, равное
ления наиб
тов меняет

Другой
ния», пока
растворе, к
ную погреш
элементов
абсорбции)
обычно не

Станда
готовят в
Концентра
центрация
линейно за

Имеется достаточный опыт определения металлов в растительных маслах и животных жирах. Метод требует разведения масла в метилизобутилкетоне (1:5) или в п-гексане (1:3). Этим методом были проанализированы китовый и рыбный жиры на содержание в них меди, железа, марганца, свинца, никеля, магния.

Из молочных жиров металлы, в частности медь, рекомендуется экстрагировать концентрированной азотной кислотой, освобожденной от следов металлов двойной перегонкой. После экстракции металлов жир удаляют петролейным эфиром. Оставшийся водно-кислотный экстракт может быть использован для анализа на атомно-абсорбционном спектрофотометре.

Однако высокое содержание в растворе белковых веществ затрудняет распыление водно-кислотного экстракта и требует применения специальной горелки с широкой щелью. Работы в этой области показали целесообразность объединения метода экстракции с последующим озолением водно-кислотного экстракта. По этой методике навеску масла (10 г) помещают в пробирку с притертой пробкой, добавляют 1 мл бидистиллированной воды, 4 мл концентрированной азотной кислоты и нагревают 15—20 мин при температуре 70°С. Жир удаляют тремя порциями петролейного эфира. Экстракт помещают в тигель, выпаривают до полного удаления влаги и озоляют в муфельной печи при температуре 500—550°С. В золе определяют содержание щелочных, щелочноземельных элементов и металлов с переменной валентностью: меди, железа, марганца.

При подготовке проб для анализов необходимо прежде всего определить величину навески продукта, исходя из оптимальной концентрации определяемых элементов. Для вычисления оптимальной концентрации используют термин «чувствительность» по каждому элементу, выражающийся в *р.р.т.* (миллионная доля в объеме раствора) или *мкг/мл*, что показывает концентрацию элемента в водном растворе, которая создает поглощение, равное 1%. Из табл. 3 видно, что чувствительность определения наиболее распространенных в пищевых продуктах элементов меняется, это зависит от условий проведения анализа.

Другой используемый термин, «лимит, или предел обнаружения», показывает концентрацию данного вещества в водном растворе, которая дает сигнал, в 2 раза превышающий основную погрешность. При определении концентрации исследуемых элементов в оптимальных аналитических пределах (20—80% абсорбции) по стандартной методике коэффициент вариации обычно не превышает 2%.

Стандартные растворы определенных концентраций металла готовят в том же растворителе, что и анализируемый образец. Концентрации должны быть приравнены к ожидаемым концентрациям в рабочем растворе. Если абсорбция стандартов линейно зависит от концентрации, то график строится по пока-

Таблица 3

Чувствительность при определении основных минеральных элементов

Название элементов	Длина волны, Å	Оптимальные рабочие пределы, мкг/мл	Чувствительность прибора на 1% абсорбции	Предел обнаружения, мкг/мл
K	7665	1—10	0,1	0,005
Na	5890	0,3—3	0,04	0,005
Ca	4227	1—10	0,1	0,01
Mg	2852	0,2—2	0,01	0,003
Fe	2483	2—20	0,15	0,02
Cu	3247	2—20	0,15	0,01
Mn	2795	2—20	0,1	0,005
Zn	2138	0,2—3	0,04	0,005

зателям для трех стандартных растворов. Если рабочая кривая нелинейна, то для определения концентрации с желаемой точностью необходимо использовать больше стандартов. Так как рабочая кривая может меняться в зависимости от условий эксперимента, ее следует проверять перед каждой новой серией анализов.

2.4.3. ВЫБОР ПЛАМЕНИ

Раствор исследуемых элементов вводится в пламя горелки и образует атомный пар. По простоте атомизации с пламенем не может сравниться никакой другой метод. Однако от температуры пламени зависит степень диссоциации тех соединений, которые образует металл. Иногда для предотвращения образования термостойких окислов, которые выводят металл из атомизированного состояния, приходится обогащать пламя различными восстановителями. Это необходимо учитывать при выборе горючего газа.

Для анализа щелочных металлов хорошо использовать обычный городской газ (пропан), который в смеси с воздухом создает температуру 1925°С. Для щелочноземельных и многих других металлов требуются более высокие температуры. Воздушно-ацетиленовое пламя имеет температуру 2300°С. Но и при этом пламени некоторые металлы, такие, как олово и алюминий, плохо диссоциируют в связи с образованием окислов. А кислые водные 8-оксихинолиновые растворы солей алюминия дают в воздушно-ацетиленовом пламени сильный абсорбционный сигнал. Это можно объяснить образованием хорошо диссоциируемого органического комплекса, который препятствует взаимодействию металла с кислородом. Из обычных растворов алюминий и олово определяются в пламени окись азота + ацетилен (температура 3000°С).

0,005
0,005
0,01
0,003
0,02
0,01
0,005
0,005

рабочая кривая
желаемой точ-
ности. Так как
условий экс-
позитивной серией

горелки и
пламенем не
от темпера-
турных, ко-
леблется обра-
зование
из атомизи-
рованных
различными
выборе горю-

овывать обыч-
ным воздухом соз-
даются и многих
температуры. Воз-
можность 00°С. Но и
так олово и
соединением окис-
лов солей алю-
миния абсорб-
ция хорошо
препятст-
вует рас-
чету окис-

Повышение температуры устраняет побочные химические по-
мехи, усиливает ионизацию для многих элементов, а следова-
тельно, увеличивает и чувствительность. Однако применение
закалки азота или кислорода в смеси с ацетиленом создает це-
лый ряд дополнительных сложностей в работе, в том числе и
взрывоопасность.

2.4.4. ИСТОЧНИКИ СВЕТА

В атомной абсорбции широкое применение получили в качестве
источника света лампы с полым катодом. Эти лампы дают яр-
кий свет с узкими спектральными линиями, они просты в ра-
боте и по конструкции. Срок службы большинства ламп около
1000 ч. Но лампы с полым катодом имеют ряд недостатков, свя-
занных с высокими требованиями к чистоте металлов, из кото-
рых они изготавливаются, с возможностью образования фоновой
радиации, снижающей чувствительность измерения. Для метал-
лов, имеющих низкую температуру плавления (олово, свинец),
трудно получить лампы с интенсивным свечением. В процессе
эксплуатации ламп с полым катодом может снижаться интен-
сивность свечения в результате снижения давления газа
в лампе, вызванного адсорбцией частиц газа поверхностью
лампы.

В настоящее время многие фирмы вводят целый ряд усо-
вершенствований с целью повышения стабильности и долговеч-
ности ламп. В нашей стране были исследованы и начали при-
меняться высокочастотные безэлектродные лампы. Проводились
работы по применению источника света со сплошным спектром
излучения. Это позволяет одновременно определить несколько
элементов. Однако чувствительность снижается, поскольку ши-
рина линий, выделяемых монохроматором, оказывается больше
ширины линий поглощения.

Много конструктивных решений предлагалось по созданию
многоэлементных ламп, которые позволяют сократить время на
проведение анализов. Однако чувствительность их оказывается
также ниже, и при эксплуатации спектр более летучих компо-
нентов сплавов постепенно исчезает. Могут возникнуть помехи,
если два элемента имеют резонансные линии, не разрешаемые
монохроматором. Поэтому исследователи предпочитают рабо-
тать с обычными однокомпонентными лампами.

2.4.5. ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Атомная абсорбция применима для анализа в пищевых продук-
тах большого числа металлов, концентрация которых в иссле-
дуемом растворе находится на уровне 1 мкг/мл. К таким эле-
ментам, кроме указанных в табл. 3, относятся кобальт, никель,
свинец, олово, хром, стронций, кадмий и др.

Методика анализа для различных продуктов одинакова, включая выбор резонансной линии, ввод в пламя горелки растворов и снятие показания прибора. Отличие заключается в подготовке образцов для исследования.

Для выбора наиболее рационального способа подготовки пробы ниже приводятся характеристики особенностей анализа отдельных элементов.

Калий и натрий. В золе многих пищевых продуктов калий занимает наибольший удельный вес.

Высокая чувствительность при определении этого металла требует значительного (в 20—100 раз) разбавления анализируемых растворов, в которых определяются микроэлементы. Никакие другие элементы не являются помехой для определения калия.

Чувствительность определения калия снижается с ростом его концентрации и концентрации кислот в растворе. Оптимальной считается 1%-ная концентрация кислот в растворе. Стандартные растворы для построения калибровочных графиков также должны содержать соответствующую концентрацию кислоты. Присутствие водорастворимых органических соединений в рабочем растворе с концентрацией около 1% не оказывает влияния на результаты определения калия. Учитывая высокие концентрации калия в пищевых продуктах, определение его в таких продуктах, как соки, вина, пиво, сахар-песок (10%-ный раствор), можно проводить без предварительного озоления.

Чувствительность определения натрия в 2,5 раза выше, чем калия. В отличие от других существующих методов определения натрия в атомной абсорбции этому элементу не мешает 10- и 100-кратное количество калия. Подготовка пробы для анализа может осуществляться любыми методами, но необходимо использовать платиновую или кварцевую посуду при озолении материала. Пищевые продукты, содержащие большое количество поваренной соли, лучше анализировать методами определения хлористых соединений.

Кальций, магний. Среди элементов, обладающих высокой чувствительностью к атомно-абсорбционному анализу, одно из первых мест занимает магний. Его определению в воздушно-ацетиленовом пламени не мешает 100-кратное количество в растворе кальция и калия, 1000-кратное — натрия, 0,1 н. растворы серной и фосфорной кислот.

Присутствие алюминия в эквивалентном количестве может мешать определению магния, поэтому его следует удалять. Определению кальция мешают фосфаты, сульфаты, кремний и алюминий.

Наиболее эффективным способом устранения влияния анионов является добавление в анализируемый раствор лантана или стронция в концентрации 1000 мг/мл, магния в концентрации 6000 мг/мл. Эти элементы устраняют также помехи от

алюминия. Если в анализируемый раствор вводится лантан, стронций или магний, то такое же количество указанных элементов необходимо добавлять и в стандартные растворы.

В составе большинства пищевых продуктов обычно содержится кальция несколько больше, чем магния, но, учитывая меньшую чувствительность определения кальция, навеску продукта для анализа рассчитывают чаще по кальцию.

Применение обычного воздушно-ацетиленового пламени для анализа водных растворов кальция и магния обеспечивает почти прямолинейный градуировочный график. Предел обнаружения кальция составляет 0,005 мкг/мл . В высокотемпературном пламени чувствительность значительно повышается. Для магния очень чувствительная линия 2852Å, а при анализе продуктов с высокой его концентрацией рекомендуют применять линию с пониженной чувствительностью — 2025Å.

Железо. Железо является элементом, обладающим средней чувствительностью к атомной абсорбции, поэтому этот метод нельзя считать идеальным при исследовании пищевых продуктов.

Средняя чувствительность (2—20 мкг/мл) и сравнительно низкое содержание железа в пищевых продуктах требуют для получения рабочего раствора использовать большие пробы на озоление. Так, для определения железа в сахаре-песке проба должна быть не менее 20 г.

Способ подготовки образца для анализа (озоление, экстракция) не оказывает влияния на точность определения железа. В алкогольных и безалкогольных напитках железо можно определять непосредственно без предварительной обработки пробы. Применяя 50%-ный спирт в качестве стандартного раствора, можно определить железо концентрацией менее 1 мкг/мл на 1% абсорбции. Определению железа не мешают органические растворители, 1000-кратные количества калия и кальция, 500-кратные — натрия и марганца и 100-кратные количества фосфора.

Для определения железа пригодны многие аналитические линии, наиболее чувствительные — 2167Å, 2523Å, 3020Å. Однако часто рекомендуется самая чувствительная — 2483Å. Абсорбция железа в водных растворах не зависит от того, в какой форме находится металл — в виде солей трехвалентного или двухвалентного железа или в форме комплексных соединений.

Медь. Медь относится к элементам, которые легко определяются атомной абсорбцией. Чувствительность ее не зависит от присутствия посторонних ионов, от тока лампы, а градуировочный график линеен до больших значений оптической плотности.

В воздушно-ацетиленовом пламени ее чувствительность менее 0,1 мкг/мл на 1% абсорбции. Наиболее чувствительные линии 3247Å и 3274Å, при больших концентрациях рекомендуется

2492Å, которая при концентрации меди 500 мкг/мл обеспечивает абсорбцию 70%.

Получение пробы для анализа можно проводить любыми методами. При сухом обугливании некоторых образцов продуктов с температурой 550°С возможны потери элемента, в этих случаях рекомендуют анализировать медь в пробах после озоления при температурах 450° и 550°С и сравнивать полученные результаты.

Подготовка образцов жира для анализа меди описана выше (см. стр. 39).

Медь легко экстрагируется и ЭДТА, и МИБК, и ПДКА при широком диапазоне рН. Экстракции не мешает 6 н. раствор соляной кислоты, 9 н. серной и присутствие до 70% хлорной. Определению меди может мешать большая концентрация натрия в анализируемом растворе (более 1%).

Марганец. Из водных растворов марганец определяется в пределах концентраций, равных меди (2—20 мкг/мл). Лучшими резонансными линиями являются 2795Å и 2798Å.

В воздушно-ацетиленовом пламени определению марганца практически не мешают равные количества железа, 300-кратное содержание калия и натрия, 100-кратное — магния, 50-кратное — фосфора. Кремний в больших количествах значительно влияет на результаты определения марганца. Добавление хлорида кальция (200 мкг/мл) позволяет устранить помехи, при этом возможно определение 1 мкг/мл марганца в присутствии 1000 мкг/мл фосфатов, сульфатов, бикарбонатов, нитратов, двуокиси кремния и многих металлов.

Если приготовить пробу путем экстрагирования системой ПДКА-МИБК, то чувствительность определения марганца повышается в 4—5 раз по сравнению с водным раствором. Комплекс ПДКА-марганец нестабилен, и анализ необходимо проводить быстро, а рН поддерживать равным 3, добавляя раствор 2%-ной уксусной кислоты.

Цинк. Цинк относится к элементам, обладающим высокой чувствительностью к атомной абсорбции. В водных растворах цинк может определяться в пределах концентрации 0,2—3,0 мкг/мл, а в случаях экстрагирования его МИБК в виде комплекса с ПДКА — до 0,02 мкг/мл. В пламени воздух-пропан и воздух-ацетилен 1 мкг/мл цинка определяется с ошибкой 2—3% в присутствии 1000-кратной концентрации сульфата, фосфата, нитрата, двуокиси кремния, железа, марганца, кальция, магния, натрия.

Помехи при определении цинка могут создавать галлогены и алюминий. При использовании латушной горелки определению цинка может мешать медь, имеющая близкую с ним по длине волны резонансную линию. Поэтому при определении цинка рекомендуют применять лампы с полым катодом без примесей меди.

При низких концентрациях цинка в растворе используют резонансную линию 2138Å, а при высоком содержании металла — линию 3076Å.

* ■ *

Пример. В качестве примера может служить определение кальция в растительных материалах или в продуктах животного происхождения. Согласно предлагаемой методике, можно определить до 0,005% кальция в сухом продукте с точностью до $\pm 1\%$.

Навеску образца для сухого озоления (2—4 г) обугливают (лучше под инфракрасной лампой — см. выше), помещают в платиновый или кварцевый тигель, озоляют в муфельной печи при температуре 500—550° С. В полученную золу добавляют 1 мл концентрированной химически чистой соляной кислоты, 3—4 мл дважды дистиллированной воды и нагревают на водяной бане до полного растворения.

Если применяют мокрый способ, то такую же навеску продукта помещают в колбу Кьельдаля емкостью 500 или 1000 мл, добавляют 4 мл смеси надхлорной и серной кислот в соотношении 7:1, 15 мл концентрированной азотной кислоты особой чистоты и озоление проводят с электроподогревом до полного разрушения органических веществ. В процессе озоления при необходимости можно добавлять азотную кислоту для удаления серной кислоты.

Колбу охлаждают, добавляют 5 мл воды, тщательно перемешивают и профильтровывают через бумажный фильтр в мерную колбу на 50 мл. Порциями по 5 мл смывают колбу и фильтр, доводя объем мерной колбы до 35 мл. После этого добавляют 10 мл раствора лантана и доводят объем до метки водой. Раствор лантана лучше приготовить из его окиси, а при отсутствии необходимой чистоты окиси — из нитрата лантана, прокаливая его при 700° С 1,5—2 ч в муфельной печи. Для приготовления основного раствора лантана отвешивают 58,65 г окиси лантана La_2O_3 , медленно добавляют 250 мл концентрированной соляной кислоты и доводят дистиллированной водой до 1000 мл. Такой раствор содержит 5% лантана и 25% (по объему) соляной кислоты.

Если необходимо разбавлять раствор для доведения концентрации кальция до 1—10 мкг/мл, то рекомендуется добавлять 1%-ный раствор серной кислоты и 1%-ный раствор лантана.

Калибровочный график для кальция строят по растворам, содержащим 0, 2, 5, 8, 10 мкг Са в 50 мл, все с содержанием 1% лантана и 5% (по объему) соляной кислоты.

Условия работы: длина волны 4227Å; щель — 1 мм, 13 Å; пламя воздуха — ацетилен; источник света — лампа с полым катодом или безэлектродная.

2.4.6. БЕСПЛАМЕННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Использование пламени для атомизации анализируемых элементов требует перевода твердых объектов исследования в раствор. Это вносит существенную сложность при анализе отдельных материалов и значительно увеличивает время на подготовку образца.

Многие годы делались попытки получения атомного пара без помощи пламени, но предлагаемые варианты значительно уступали методу пламенной ионизации. В 1959 г. Б. В. Львов предложил графитовую кювету для термического разложения соединений до атомного состояния [127]. Но электродуговой способ атомизации значительно усложнял технику и методику

измерения. В 1967 г. автор кюветы применил электроконтактный метод термического разложения, который дал возможность на несколько порядков повысить чувствительность беспламенной атомно-абсорбционной спектроскопии и успешно решить многие аналитические задачи.

Оптические фирмы начинают выпускать специальные комплекты к атомно-абсорбционным спектрофотометрам для беспламенного анализа. Для проведения анализа определенное количество пробы вводят в графитовую кювету, обогреваемую электрическим током. Программирование температуры позволяет высушить продукт, разрушить и провести атомизацию. Монохроматический луч света пропускают через кювету и измеряют атомное поглощение определяемого элемента.

Универсальная графитовая кювета пригодна для всех биологических материалов. Жиры в кювете количественно разлагаются без потерь и анализируются, как любые водные растворы. Небольшие размеры кюветы позволяют быстро ее разогреть, получить высокую плотность атомов, что обуславливает хорошую чувствительность и большую точность.

Новый метод получает в настоящее время все более широкое применение в исследовании минерального состава продуктов растительного и животного происхождения.

Хромат
универс
лиза сл
ластях
примен
тов. Хр
щевых
так ка
случае
делени
ния ан
необыч
ведени
става,
в хран
добаво
личест
различ
Хро
смеси
в дина
пользо
выбра
От
жит М
менил
В
множе
метод

3

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

3.1. ОСНОВЫ ТЕОРИИ И ВИДЫ ХРОМАТОГРАФИИ

3.1.1. ПРИНЦИП ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

Хроматография является одним из наиболее эффективных и универсальных физико-химических методов разделения и анализа сложных смесей веществ. Она используется в разных областях исследования и за последнее время с большим успехом применяется при изучении состава и качества пищевых продуктов. Хроматографические методы незаменимы при оценке пищевых продуктов, имеющих очень сложный химический состав, так как позволяют проводить трудноосуществимые, а в ряде случаев невыполнимые другими лабораторными методами разделения при высокой степени их точности и скорости проведения анализа. Именно хроматографические методы позволили необычайно расширить исследования во всех областях товароведения пищевых продуктов: при изучении их химического состава, пищевой полноценности и прогнозировании стойкости в хранении, при определении аромата и запаха, при определении добавок в пищевые продукты, при установлении остаточных количеств ядохимикатов в пищевых продуктах, при исследовании различных пленочных и упаковочных материалов.

Хроматографией называют процесс разделения сложной смеси веществ на компоненты с помощью сорбционных методов в динамических условиях. В основу метода заложена идея использования различной сорбируемости компонентов смеси на выбранном сорбенте.

Открытие хроматографии как метода разделения принадлежит М. С. Цвету — русскому ученому-ботанику, который применил принцип адсорбции для анализа хлорофилла (1903 г.).

В настоящее время термин «хроматография» охватывает множество методов разделения. Все хроматографические методы основаны на распределении вещества между двумя

несмешивающимися фазами. Одна из фаз неподвижна и омывается другой фазой — подвижной. Роль неподвижной фазы могут выполнять твердые тела или жидкости, а в качестве подвижной фазы используют жидкость или газ.

Таким образом, хроматографические методы всегда связаны с движением газообразной или жидкой фазы, содержащей смесь разделяемых веществ, через неподвижный слой сорбента. Благодаря различному распределению компонентов смеси между неподвижной и подвижной фазами происходит их разделение.

3.1.2. ОСНОВНЫЕ ВИДЫ ХРОМАТОГРАФИИ И ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ

Хроматографические методы принято классифицировать в соответствии с выбранным типом подвижной и неподвижной фаз [3, 21, 175, 190]. Газовая хроматография (ГХ) объединяет те методы, в которых подвижной фазой является газ, жидкостная хроматография (ЖХ) — методы, в которых подвижной фазой служит жидкость.

В зависимости от агрегатного состояния обеих фаз различают следующие виды хроматографии: твердо-жидкостную (ТЖХ), жидкость-жидкостную (ЖЖХ), газо-адсорбционную (ГАХ), газо-жидкостную (ГЖХ).

В основе хроматографических методов лежит широкий круг физико-химических процессов: распределение, адсорбция, ионный обмен, диффузия, комплексообразование и др. [3, 158, 190]. В зависимости от природы процесса, обуславливающего механизм разделения, т. е. от типа взаимодействия между компонентами разделяемой смеси, подвижной и неподвижной фазами различают следующие основные варианты хроматографии: распределительную, адсорбционную, ионообменную и гель-фильтрационную.

Деление хроматографии на типы по характеру действующих сил является в значительной степени условным и основано лишь на относительном преобладании одной из действующих сил, так как динамическое равновесие в сорбционных процессах достигается в результате одновременного действия сил различной природы.

Хроматографические методы принято классифицировать также по методике проведения эксперимента. Различают фронтальный, проявительный (элюентный) и вытеснительный способы получения хроматограмм [3, 158, 175].

Фронтальный способ заключается в фильтровании исследуемого раствора через колонку с сорбентом, в результате чего на нем образуются зоны, содержащие последовательно увеличивающееся число компонентов, а из колонки вначале выходит порция наименее сорбирующегося компонента. При этом в чистом виде можно получить лишь часть первого компонента,

сорбент после каждого разделения нуждается в регенерации. В настоящее время этот метод находит применение в основном лишь для очистки больших количеств смеси от следов сильно адсорбируемых примесей.

Вытеснительная хроматография заключается в вытеснении компонентов смеси раствором какого-либо вещества (вытеснителя), сорбирующегося сильнее, чем компонент разделяемой смеси.

Проявительный способ основан на том, что жидкая или газообразная смесь веществ вносится в верхнюю часть колонки, которая затем вымывается (элюируется) из нее непрерывным потоком растворителя или газа. Благодаря различной адсорбции или растворимости компонентов пробы время пребывания их молекул в неподвижной фазе различно. Поэтому вымывание отдельных компонентов пробы происходит с разной скоростью. Концентрационное распределение чаще всего симметрично и имеет вид гауссовой функции. Этот метод получил наибольшее распространение и в ГХ, и в ЖХ. Преимущество метода заключается в том, что сорбент непрерывно регенерируется элюентом, а при выборе соответствующих условий компоненты могут быть полностью разделены, так как между каждым из вымываемых компонентов образуется зона чистого растворителя или газа-носителя.

Широко распространена классификация хроматографических методов по видам тех вспомогательных средств, которые в них используются. Различают хроматографию: бумажную, колоночную, тонкослойную и газовую.

Кроме перечисленных, существуют и другие способы анализа: с образованием нерастворимых комплексов; электрохроматографический, при котором используется постоянное электрическое поле; термохроматографический, основанный на различии в адсорбируемости веществ при изменении температуры, и др. [158, 175].

В связи с тем, что хроматографические методы чрезвычайно разнообразны, классификация их является достаточно сложной (табл. 4). Несмотря на определенные условности классификации, она позволяет устанавливать полезную связь между отдельными вариантами. В настоящее время принято говорить о двух направлениях развития хроматографических методов: жидкостной и газовой [21, 190].

Преимущественное развитие получила ГХ, чему способствовало создание чувствительных и универсальных газовых хроматографов с автоматическим детектированием. В обычном варианте ГХ может быть использована для разделения и анализа только достаточно летучих и термически устойчивых веществ. Области применения ГХ расширяются с развитием пиролизной, реакционной, высокотемпературной и при высоких давлениях хроматографии.

Классификация различных видов хроматографии

Таблица 4

Вид хроматографии	Формы осуществления
Жидкостная (подвижная фаза — жидкость)	
твердожидкостная:	
адсорбционная	Колоночная, тонкослойная
ионообменная	» »
гель-фильтрационная	» »
жидкость-жидкостная:	
распределительная	Колоночная, тонкослойная, бумажная
с использованием комплексообразования	Колоночная, тонкослойная
Газовая (подвижная фаза — газ):	
газоадсорбционная	Колоночная
газожидкостная (распределительная)	»

В последние годы начала быстро развиваться ЖХ, что стало возможным (как и для ГХ) также благодаря успехам в создании чувствительных детекторов для растворов механически прочных высокоэффективных адсорбентов, позволяющих применять большие давления жидкости у входа в колонку. Поэтому в настоящее время ЖХ получает преимущества ГХ: большую скорость разделения, высокую чувствительность и, кроме того, обеспечивает разделение смесей веществ в диапазоне молекулярных весов от 300—500 (верхний предел для ГХ) до нескольких миллионов. Современному состоянию высокоскоростной ЖХ посвящен ряд монографий [159, 162, 190].

Выбор того или иного метода хроматографии зависит от многих причин. Для того чтобы выполнить исследование с наибольшей точностью и чувствительностью, с наименьшей затратой труда и времени, экспериментатор должен ясно представлять цель своего исследования, необходимую степень точности анализа, а также учитывать возможности лаборатории.

Каждый из методов хроматографии является специфичным и обладает определенными преимуществами. Более полные и точные результаты можно получить, используя различные виды хроматографии, взаимно дополняющие друг друга.

3.2. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (ГХ)

3.2.1. ОСНОВЫ МЕТОДА

Принцип метода

ГХ приобрела большое значение как наиболее эффективный и универсальный метод разделения в самых разных областях. Метод ГХ хорошо поддается автоматизации, в чем его неоспоримое преимущество перед другими современными физико-хи-

мическими исследованиями. Будучи одновременно и качественным, и количественным методом анализа сложных смесей различных органических и неорганических соединений, ГХ должна использоваться и для комплексного изучения пищевых продуктов. Метод применим для разделения газов, жидких или твердых веществ, способных перегоняться без разложения при температурах до 400—500° С. С помощью ГХ анализируют и такие соединения, которые могут быть превращены в летучие производные или производные, которые можно подвергать пиролизу [20]. В настоящее время опубликовано значительное количество монографий и работ, посвященных теории и практике ГХ [23, 44, 122, 131, 155, 175, 196].

ГХ является частным случаем хроматографических методов, когда подвижной фазой является газ. Таким образом, ГХ представляет собой процесс, в котором разделение смеси производится с помощью подвижной газовой фазы, проходящей над сорбентом. В качестве газа-носителя выбирают газ, практически не адсорбирующийся и не растворяющийся в неподвижной фазе при температуре колонки и химически не реагирующий с компонентами смеси (азот, гелий, аргон).

Разделение компонентов смеси основано на различной адсорбируемости (ГАХ) или растворимости (ГЖХ) анализируемых компонентов при движении их газообразной смеси вдоль поверхности твердого тела или неподвижной жидкости в хроматографической колонке. ГАХ является исторически более ранним методом и применяется преимущественно в случае анализа газовых смесей или относительно неполярных веществ с высокой летучестью. Область применения ГЖХ значительно шире, так как этот метод применим к более разнообразным веществам, к тому же допускает использование не только насадочных, но и капиллярных колонок.

Среди хроматографических методов ГХ является наиболее разработанным. Промышленность выпускает хроматографы многих марок. Основные характеристики, определяющие аналитические возможности современных хроматографов, в том числе и зарубежных, эксплуатируемых в СССР, правила работы и наиболее часто встречающиеся неисправности их аппаратуры подробно освещены во многих работах [44, 131, 169, 196].

Современный газовый хроматограф представляет собой автоматический прибор, требующий от обслуживающего персонала выполнения небольшого числа операций. Принципиальная схема газового хроматографа показана на рис. 4.

В ГХ используется проявительный метод. Необходимое количество пробы отбирают специальным микрошприцем и вводят в поток газа-носителя через резиновое уплотнение дозатора-испарителя, который обеспечивает быстрое и полное испарение жидкой смеси, так как температура его устанавливается

на $50-70^{\circ}\text{C}$ выше температуры наиболее высококипящего компонента пробы. Испаренная проба потоком газа-носителя подается в колонку и перемещается вдоль нее. Температуру колонки устанавливают такую, при которой компоненты анализируемой смеси находятся в парообразном состоянии.

При прохождении через колонку отдельные компоненты смеси улавливаются (адсорбируются) активным адсорбентом, которым наполнена колонка (ГАХ), или растворяются в пленке неподвижной жидкой фазы, нанесенной на поверхность инертного носителя (ГЖХ). Поскольку компоненты смеси сорби-

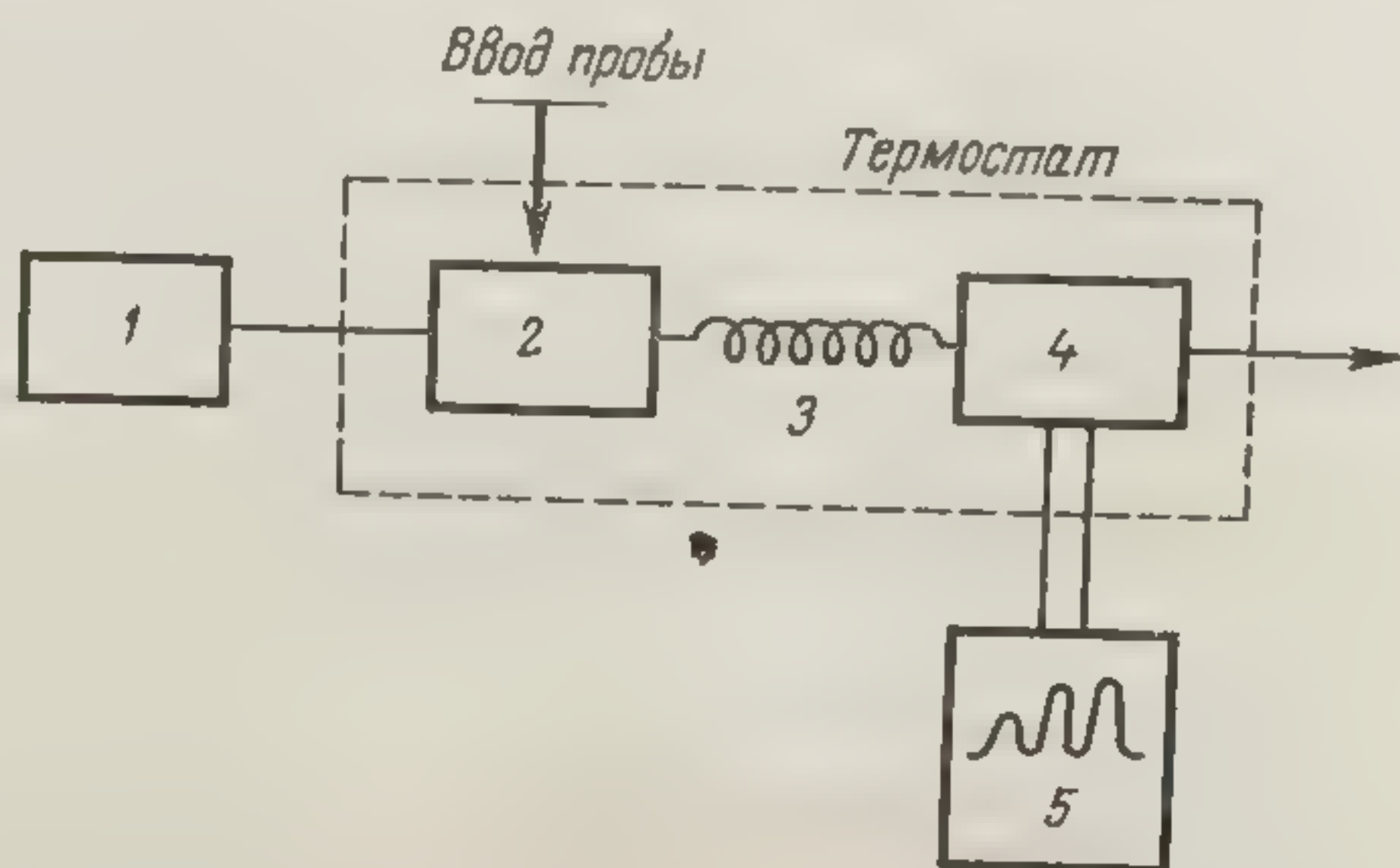


Рис. 4. Схема газового хроматографа:

1 — источник газа-носителя; 2 — испаритель; 3 — колонка;
4 — детектор; 5 — самописец

руются неодинаково или по-разному взаимодействуют с жидкой фазой, продвигаются они по колонке с различными скоростями. Молекулы компонентов, сорбирующиеся лучше или с более высокой растворимостью в жидкой фазе, задерживаются (отстают) в своем движении. Неадсорбируемые или нерастворимые компоненты выходят из колонки первыми.

Вымываемые из колонки компоненты регистрируются детектором в виде сигналов, зависящих от времени. Эти сигналы воспроизводятся на самописце хроматографа в виде серии пиков. Расположение пиков или скорость их появления дает качественную характеристику анализируемой пробы, а площадь пиков используется для определения концентраций компонентов в процентах.

Свойства детекторов

Большинство работ по ГХ выполняются с помощью дифференциальных детекторов, сигнал которых пропорционален мгновенной концентрации компонента в бинарной смеси. Детектор позволяет выяснить, что получается на выходе из колонки, об-

наруживает и измеряет малые количества компонентов, присутствующих в потоке газа-носителя. Поэтому возможности хроматографа в основном обусловлены характеристикой используемого в нем детектора. Различные хроматографы отличаются в основном принципом детектирования и используемой максимальной рабочей температурой.

Общие требования, предъявляемые к детектору. Дифференциальные детекторы измеряют некоторое свойство компонента, связанное с его концентрацией в потоке газа-носителя. Поскольку концентрация компонентов в элюате изменяется очень быстро, детектор должен обладать малой инерционностью. Хроматографический детектор должен быть универсальным, так как в процессе анализа данной смеси через него могут проходить бинарные смеси газа-носителя с веществами самого различного строения.

Обычно концентрации анализируемых компонентов в элюате малы (особенно при определении примесей), поэтому детектор должен быть очень чувствителен. Так как показания детектора используются для количественных расчетов, желательна линейная зависимость его сигнала от количества определяемого вещества. Детектор должен обеспечивать возможность непрерывной автоматической регистрации показаний в процессе анализа.

Типы детекторов. Предложено более 30 способов детектирования. Основные методы заключаются в сравнении какого-либо свойства чистого газа-носителя с аналогичным свойством смеси (газ-носитель + компонент смеси).

В хроматографической практике большое распространение получили следующие типы детекторов.

Детекторами, работающими по принципу измерения теплопроводности, являются катарометры. Действие их основано на сравнении теплопроводности потоков чистого газа-носителя и газа-носителя с примесями разделенных компонентов, выходящих из колонки. Теплопроводность смеси (газ-носитель + компонент) изменяется в зависимости от концентрации компонента. Эти изменения и записываются в виде электрического сигнала на потенциометре.

Катарометр прост в эксплуатации, позволяет анализировать разнообразные соединения, при этом компоненты, проходя через детектор, не изменяются, что позволяет улавливать их в ловушках после анализа для последующего исследования. Но все детекторы этого типа чувствительны к колебаниям скорости потока газа-носителя, поэтому она должна тщательно контролироваться. Кроме того, величина показаний катарометра не всегда линейно изменяется с изменением концентрации пара, для количественного анализа необходима калибровка по смесям известного состава в соответствующем диапазоне. Его нельзя использовать для определения очень малых количеств веществ в исследуемой смеси, например при изучении аромата

пищевых продуктов, а также при работе с капиллярными и насадочными колонками малого диаметра, что объясняется не-большой чувствительностью и значительной инерционностью.

Более современные, более чувствительны и более перспективны ионизационные детекторы, работающие по принципу измерения ионизационных свойств газа. Действие пламенно-ионизационного детектора (ПИД) основано на ионизации в водородном пламени и заключается в следующем. В поток, выходящий из колонки, вводится постоянный расход водорода, и смесь сжигается в герметичной камере.

При горении чистого водорода количество ионов, образующихся в камере, очень мало, а в присутствии органических веществ, содержащих углеродный атом, количество ионов резко возрастает. Ионы, образующиеся в пламени, создают ток, причем сила ионного тока пропорциональна количеству поступающего в горелку вещества. Ионный ток усиливается и записывается автоматически потенциометром. Чувствительность его выше, чем у катарометра. Минимально детектируемые с помощью ПИД количества веществ от $1 \cdot 10^{-12}$ до $10 \cdot 10^{-12}$ г/сек, причем 10^{-12} — 10^{-11} считается нормальным диапазоном значений нижнего предела детектирования.

ПИД чувствителен фактически ко всем органическим соединениям и не чувствителен к постоянным газам и воде. Сигнал детектора линейен по отношению к концентрации вещества в широком интервале. Площадь пика пропорциональна общему количеству вещества и не зависит от скорости газа-носителя и температуры детектора. Сочетание высокой чувствительности и широкого линейного диапазона обусловило применение ПИД для анализа пищевых продуктов.

Чувствительность детектора в значительной степени определяется соотношением между количеством подаваемых в горелку водорода и воздуха, а также расстоянием между электродами. Поэтому необходимо следить за правильным выбором скоростей газов. Соотношение скоростей потоков водорода, газа-носителя и воздуха должно быть 1 : 1 : 10.

Имеются и другие типы ионизационных детекторов, в которых ионы образуются не в результате сжигания смеси, а под действием на нее радиоактивного излучения, тлеющего ряда и т. д.

Разработаны детекторы специальных конструкций с избирательной чувствительностью, которые высокочувствительны к одним соединениям и не чувствительны к другим.

Сравнительно новым является детектор по электронному захвату. В отличие от обычных детекторов электронозахватный детектор измеряет не увеличение тока, а его уменьшение. При протекании азота через детектор происходит ионизация молекул азота под действием радиоактивного β -излучателя (обычно тритий или плутоний-239) и образуются мед-

ленные электроны. Под влиянием постоянного напряжения эти медленные электроны перемещаются к аноду, в результате чего возникает постоянный ток. При попадании в пространство между электродами компонентов пробы, содержащих молекулы, которые способны захватить свободные электроны, происходит уменьшение этого тока. Уменьшение тока является функцией количества вещества и сродства к электрону (способности захватывать электроны) для данного вещества.

Этот детектор чрезвычайно чувствителен по отношению к соединениям с высоким сродством к электрону (алкилгалогениды, сопряженные карбонилы, нитрилы, нитраты, металлоорганические соединения) и фактически не чувствителен к углеводородам, спиртам и кетонам, имеет лишь небольшую линейную область, что делает его непригодным для обычных количественных анализов. Однако по захвату электронов детектор незаменим при анализе микро- и субмикроколичеств хлор- и фосфорорганических ядохимикатов, когда нельзя применить другие детекторы. Минимальные детектируемые концентрации хлорорганических ядохимикатов от $0,4 \cdot 10^{-9}$ до $9 \cdot 10^{-9}$ мг/сек. Некоторые пестициды, как показали последние исследования, могут быть определены в субпикограммовых количествах — 10^{-13} г [50, 131].

Свойства хроматографических колонок

Наиболее важной частью хроматографа являются колонки, которые подготавливаются самим исследователем. Существуют колонки набивные (в ГАХ и ГЖХ) и капиллярные (в ГЖХ).

Набивные (насадочные) колонки чаще всего изготавливают из нержавеющей стали, меди, алюминия и стекла, диаметром 3—6 мм, длиной от 20 см до 8 м, что зависит от состава анализируемой смеси. На колонках длиной 2—3 м можно достичь удовлетворительного разделения. Более длинные колонки используют для работы с трудноразделяемыми смесями.

Капиллярные колонки с внутренним диаметром 0,01—0,5 мм могут быть очень длинными — до 30—100 м и более, на них достигается очень высокая эффективность и быстрота разделения пробы.

Колонка подбирается с особой тщательностью самим исследователем. В колонке, заполненной определенной насадкой, происходит процесс разделения смеси. От выбора применяемой в ней неподвижной фазы в значительной мере зависит успех или неудача конкретной операции разделения.

Неподвижная фаза бывает двух видов: твердый адсорбент и нелетучая жидкость, нанесенная на инертный твердый носитель или на внутреннюю стенку капиллярной трубки.

В ГАХ колонка заполнена только твердым адсорбентом. В качестве такового применяют активированный уголь, силикагель, окись алюминия, цеолиты и другие соединения, обладающие большой адсорбционной способностью, благодаря чему и обеспечивается разделение компонентов анализируемой смеси.

Этот вид хроматографии (ГАХ), как уже указывалось, в основном представляет ценность как метод анализа постоянных газов и низкокипящих веществ. Однако за последнее время ГАХ получает значительно большее распространение в связи с применением новых типов адсорбентов с химически и геометрически упорядоченной поверхностью, а также адсорбентов, представляющих собой пористые полимерные материалы (сополимеры стирола и дивинилбензола, этилвинилбензола), которые можно также использовать в качестве инертных носителей неподвижных жидких фаз [126].

Преобладающее число исследований в настоящее время выполняется с помощью ГЖХ, т. е. на колонках, заполненных инертным порошком, который пропитан нелетучей жидкостью.

В ГЖ насадочной колонке необходим твердый носитель для создания большой инертной поверхности, на которую наносится жидкая фаза в виде сплошной тонкой пленки. Носитель не должен адсорбировать анализируемые вещества сквозь пленку нанесенной жидкости, т. е. непосредственно в сорбционных процессах носитель не участвует. Роль его сводится в основном к поддержанию жидкой неподвижной фазы в таком состоянии, чтобы через нее мог проходить газовый поток.

Используемые в качестве носителя вещества должны обладать достаточно большой удельной поверхностью, быть химически инертными (не реагировать с жидкой фазой, компонентами разделяемой смеси даже при повышенных температурах), термически стабильными, механически прочными, достаточно свободно пропускать поток газа-носителя. Твердый носитель должен иметь ячеистую структуру с определенным размером частиц, при этом существенное значение имеет их однородность, поскольку от этого зависит равномерность потока газа-носителя.

Из твердых носителей известны диатомитовые (целит-545, различные хромосорбы), стеклянный бисер, керамические материалы, гранулированные полимеры, свойства которых подробно рассмотрены в справочнике А. А. Лурье [126].

В капиллярной колонке неподвижная фаза наносится на внутреннюю поверхность трубки, т. е. стенка капиллярной трубки служит твердым носителем вместо специального инертного твердого вещества.

Наибольшие трудности представляет выбор неподвижной жидкой фазы (НЖФ), обладающей достаточной избирательностью. Понятие избирательности всегда конкретно и относится к той или иной смеси веществ [104, 155, 175, 122].

В общем
творителем
летучей и ус
точно эффек
рода НЖФ
вадет влиян
смеси, обу
Разнообр
личными ис
сифицирован
не поля
которые по
смеси угле
SE-30, IXR,
разделения
температура
слабоп
эфирь высо
дибутилфтал
фосфат (для
различных
лярных кисл
сильно
мологов и
тов, альдегид
ных спиртов
кольсукцинал
т. п. (для ра
нокислот, те
ния гликоле
Полярны
и более ле
Для практи
кой фазы и
Как вид
природу, чт
развитие. В
можно наде
получить на
Темпера
пределения
температур
водит к ух
выбирать с
приемлемы
разделения
навливаются
смеси.

В общем случае жидкая фаза должна быть хорошим растворителем для разделяемых компонентов, по существу не летучей и устойчивой при рабочей температуре колонки, достаточно эффективной, чтобы достичь желаемого разделения. Природа НЖФ является тем основным фактором, который оказывает влияние на коэффициент распределения компонентов смеси, обуславливает порядок их выхода из колонки.

Разнообразные органические вещества, применяемые различными исследователями в качестве НЖФ, могут быть классифицированы на три группы:

неполярные — вакуумные смазки, апиезоны и сквален, которые по химической природе представляют собой сложные смеси углеводородов, а также диметилполисилоксаны типа SE-30, IXR, OV-1 или близкие им по свойствам вещества (для разделения углеводородов, эфиров кислот в соответствии с их температурами кипения);

слабополярные — некоторые силиконовые полимеры, эфиры высокомолекулярных спиртов и двухосновных кислот: дибутилфталат, динонилфталат, диоктилсебацат, трикрезилфосфат (для разделения гомологов и изомеров углеводородов различных классов, спиртов, альдегидов, эфиров, низкомолекулярных кислот);

сильнополярные — полигликоли (для разделения гомологов и изомеров полярных органических соединений: спиртов, альдегидов, дикетонов, кетокислот), полиэфиры двухатомных спиртов и двухосновных кислот, такие, как полиэтиленгликольсукцинат — ПЭГС, полиэтиленгликольадипинат — ПЭГА и т. п. (для разделения эфиров жирных кислот, производных аминокислот, терпенов), цианэтилированные спирты (для разделения гликолей, многоатомных спиртов, фенолов, терпенов).

Полярные НЖФ, как правило, менее термически стабильны и более летучи, чем обычно применяемые неполярные фазы. Для практической работы существенно знать полярность жидкой фазы и температурные границы ее применения [44, 155, 175].

Как видно, жидкая фаза может иметь самую различную природу, что определяет универсальность ГХ и стимулирует ее развитие. В принципе для всякой задачи по разделению смеси можно надеяться найти одну или несколько фаз, позволяющих получить наилучшие результаты.

Температура колонки сильно влияет на коэффициент распределения в ней веществ. В большинстве случаев повышение температуры колонки уменьшает время удерживания, но приводит к ухудшению разделения. Это противоречие заставляет выбирать оптимальную температуру, при которой достигается приемлемый компромисс между величинами коэффициентов разделения и временем анализа. Температура в колонке устанавливается примерно равной средней температуре кипения смеси.

При анализе смесей веществ, содержащих компоненты, резко отличающиеся по летучести, хроматографию рекомендуется осуществлять в условиях автоматического программирования температуры. При этих условиях не только уменьшается время выхода компонентов, но и улучшается форма пиков, а также обнаруживаются пики, которые при других методах анализа не могли быть замечены из-за их размытой формы [203].

Качественный анализ

Существуют различные методы, позволяющие качественно идентифицировать компоненты смеси, которые соответствуют отдельным пикам на хроматограмме.

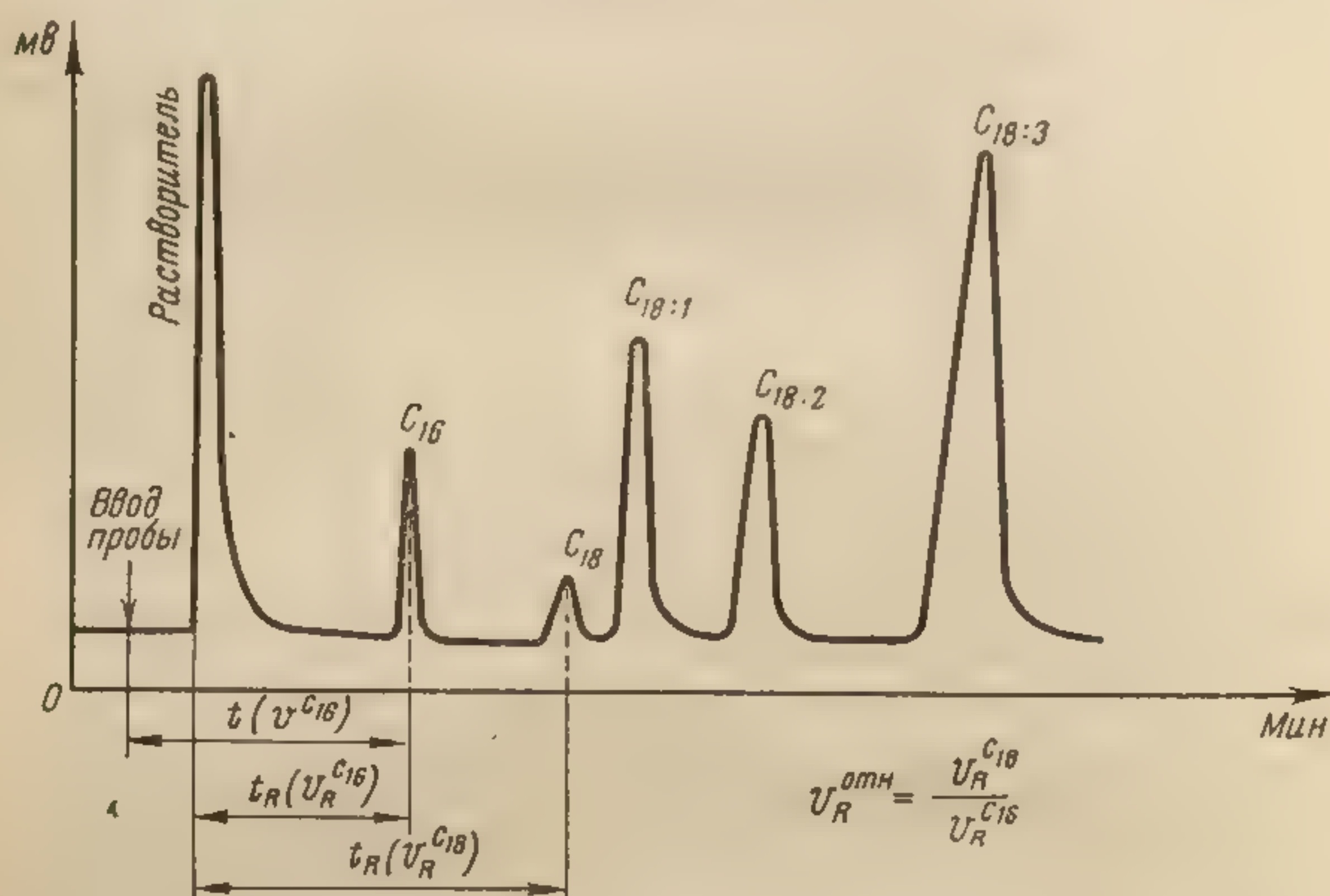


Рис. 5. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот льняного масла.

C_{16} — пальмитат; C_{18} — стеарат; $C_{18:1}$ — олеат; $C_{18:2}$ — линолеат; $C_{18:3}$ — линоленат; $t(V)$ — время (объем) удерживания; $t_R(V_R)$ — исправленное время (объем) удерживания

Идентификация по величинам удерживания. Одной из главных характеристик ГХ является время удерживания данного компонента (t), т. е. время от момента ввода пробы до момента появления максимума соответствующего пика (рис. 5). Кроме того, необходимо знать приведенное (исправленное) время удерживания (t_R), измеряемое от момента появления пика воздуха (или передней границы пика растворителя для ионизационного детектора) до выхода максимума пика. Времени удерживания соответствует объем удерживания (V_R), т. е.

объем газа, прошедшего через колонку с момента ввода пробы до момента появления максимума пика на хроматограмме. Исправленное время удерживания или удерживаемый объем являются характеристиками вещества при заданных условиях анализа.

Наиболее надежным показателем являются относительные величины времени или объема удерживания $V_R^{отн}$, представляющие отношение времени (или объема) удерживания данного компонента к соответствующим показателям известного вещества, принятого за стандарт. Относительное удерживание не зависит от длины колонки, скорости потока и количества неподвижной фазы, но зависит от температуры колонки и природы жидкой фазы. В связи с простотой определения и надежностью этой величины идентификацию пиков проводят по относительному удерживанию.

Сравнивая экспериментально найденное время (или объем) удерживания с опубликованными данными [23, 44, 155], можно провести идентификацию для неизвестной смеси веществ. Однако такой способ идентификации требует обоснованных предположений о химической природе исследуемой смеси.

Невозможность исчерпывающего качественного анализа с использованием только значений удерживания связана в основном с тем, что ГХ не позволяет определять или различать органические функциональные группы. Некоторые соединения — члены различных гомологических рядов могут иметь одинаковое время удерживания, что затрудняет ГХ-анализ смесей таких соединений. Если функциональная группа исследуемого соединения неизвестна, то по величине удерживания можно лишь указать несколько возможных вариантов идентификации этого соединения.

Идентификация с помощью стандартных смесей веществ. Одним из простейших методов идентификации пиков является сравнение величин удерживания компонентов изучаемой смеси с соответствующими величинами, полученными при хроматографии заведомо известных веществ. Этот способ применим только при наличии в чистом виде всех предполагаемых компонентов изучаемой смеси, а идентификация может считаться надежной лишь в том случае, когда совпадают величины удерживания более чем на одной НЖФ.

Идентификация по логарифмическим зависимостям, существующим для гомологических рядов. Разработаны и другие способы идентификации, основанные на существовании линейной зависимости между логарифмом относительного удерживания объема и числом углеродных атомов в цепи в пределах одного гомологического ряда при определенной температуре. График такой зависимости для гомологических рядов метиловых эфиров жирных кислот приведен на рис. 6.

Для более точной идентификации рекомендуется анализировать одну и ту же смесь на колонках с различной полярностью (например, с апиезоном и ПЭГС). При построении графика за-

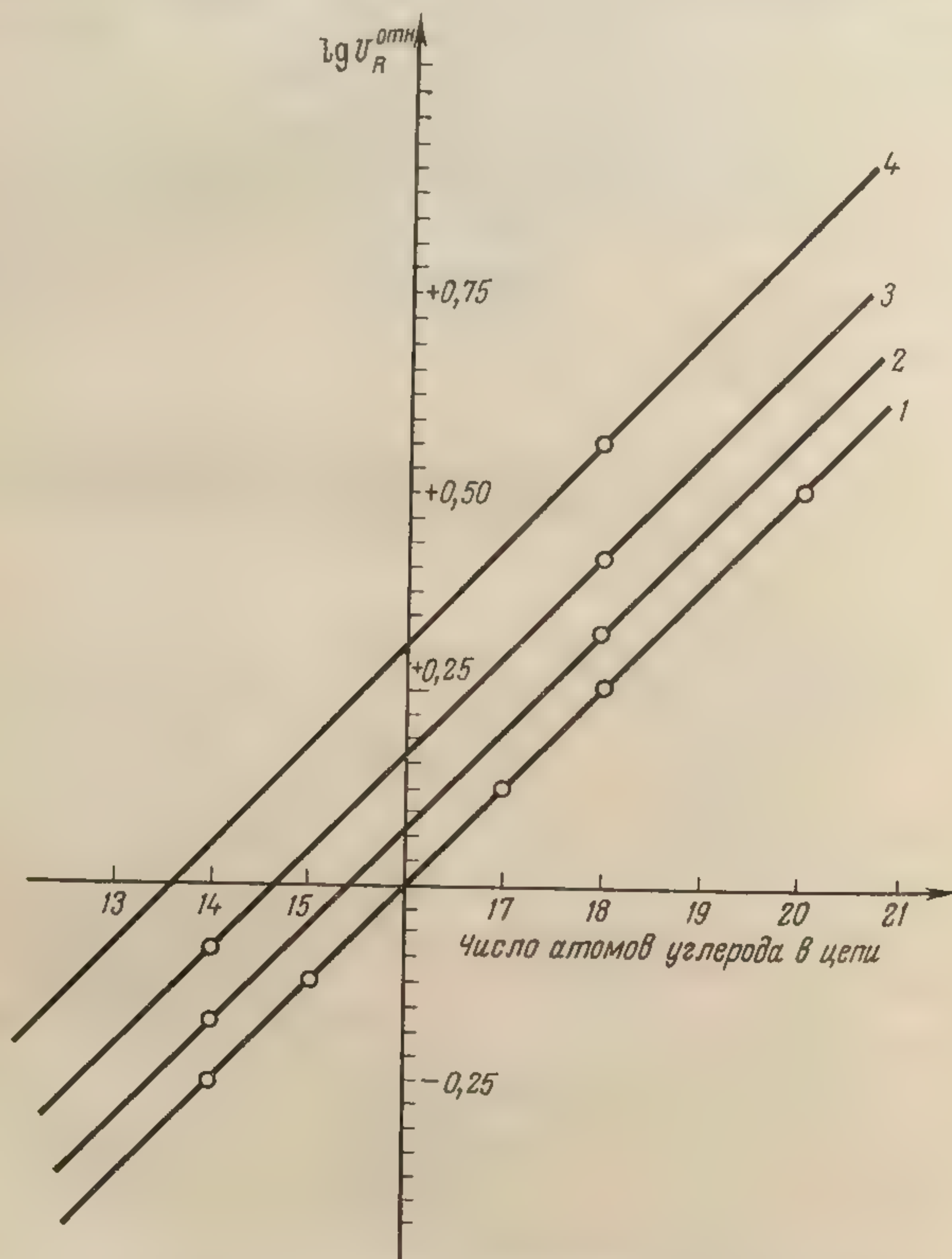


Рис. 6. Зависимость логарифма относительного (по метилпальмитату) объема удерживания ($\lg V_R^{\text{относ}}$) от числа углеродных атомов в цепи для гомологических рядов метиловых эфиров жирных кислот:

1 — насыщенных; 2 — моно-, 3 — ди- и 4 — триэтиленовых

зависимости между удерживаемыми объемами на двух различных НЖФ получают прямые линии для каждого гомологического ряда, причем угол наклона прямой характерен для данной функциональной группы.

Идентификация в сочетании с физико-химическими методами. Наряду с указанными методами используют и другие способы идентификации. Известен простой способ применения качественных реакций для идентификации соединений, выходящих из газового хроматографа с насадочной колонкой и ката-рометром. Часто для получения качественной информации применяют улавливание веществ в специальных охлаждаемых ловушках и их последующую идентификацию обычно методами спектрометрии в УФ-, ИК-областях, на масс-спектрометрах [140, 175, 155].

Количественный анализ

Наиболее важные проблемы, связанные с количественным анализом, и основные источники встречающихся ошибок проанализированы в ряде работ [131, 175, 228, 241].

Количественные измерения большинства хроматограмм с помощью дифференциальных детекторов основаны на определении площади зарегистрированного пика, поскольку площадь пика пропорциональна концентрации компонента. В отдельных случаях при расчетах используют высоту пиков, особенно для частично разделенных или выходящих на «хвосте» соседних пиков.

Но, как известно, сигнал дифференциального детектора зависит от природы анализируемых соединений. Поэтому для получения точных количественных результатов необходимо знать индивидуальную чувствительность детектора к определяемым веществам. Для этого следует проводить калибровку детектора по смесям известного состава и затем при расчете вводить поправочный коэффициент, чтобы восстановить истинную пропорциональность между концентрацией и площадью пика. Таким образом, цель калибровки заключается в определении количественной связи между сигналом детектора и абсолютным содержанием компонента.

В зависимости от метода калибровки поправочные коэффициенты могут быть использованы для расчета содержания компонентов в весовых, объемных или молярных процентах. В опубликованной литературе подробно рассмотрена методика расчета поправочных коэффициентов для ПИД и детектора по теплопроводности [131] и методика приготовления стандартных смесей для калибровки [22], а также сводки поправочных коэффициентов для различных типов детекторов [23, 155].

Мерой количества разделенного вещества служит относительная площадь соответствующего пика на хроматограмме.

Определение площадей хроматографических пиков. Существуют различные методы измерения площади пика: планиметрический (форма пика не играет роли);

путем умножения высоты пика на его ширину, измеренную на середине высоты (рис. 7, 1); метод отличается быстротой и достаточной точностью, если пики симметричны или почти симметричны;

путем взвешивания вырезанных из бумаги пиков; форма пика не имеет значения, но могут возникнуть погрешности, обусловленные неточностью вырезания, ошибкой взвешивания, неоднородностью бумаги;

с помощью интеграторов, непосредственно присоединенных к самописцам так, что измерение площади может производиться одновременно с записью хроматограммы; наиболее совершенным признан электронный интегратор.

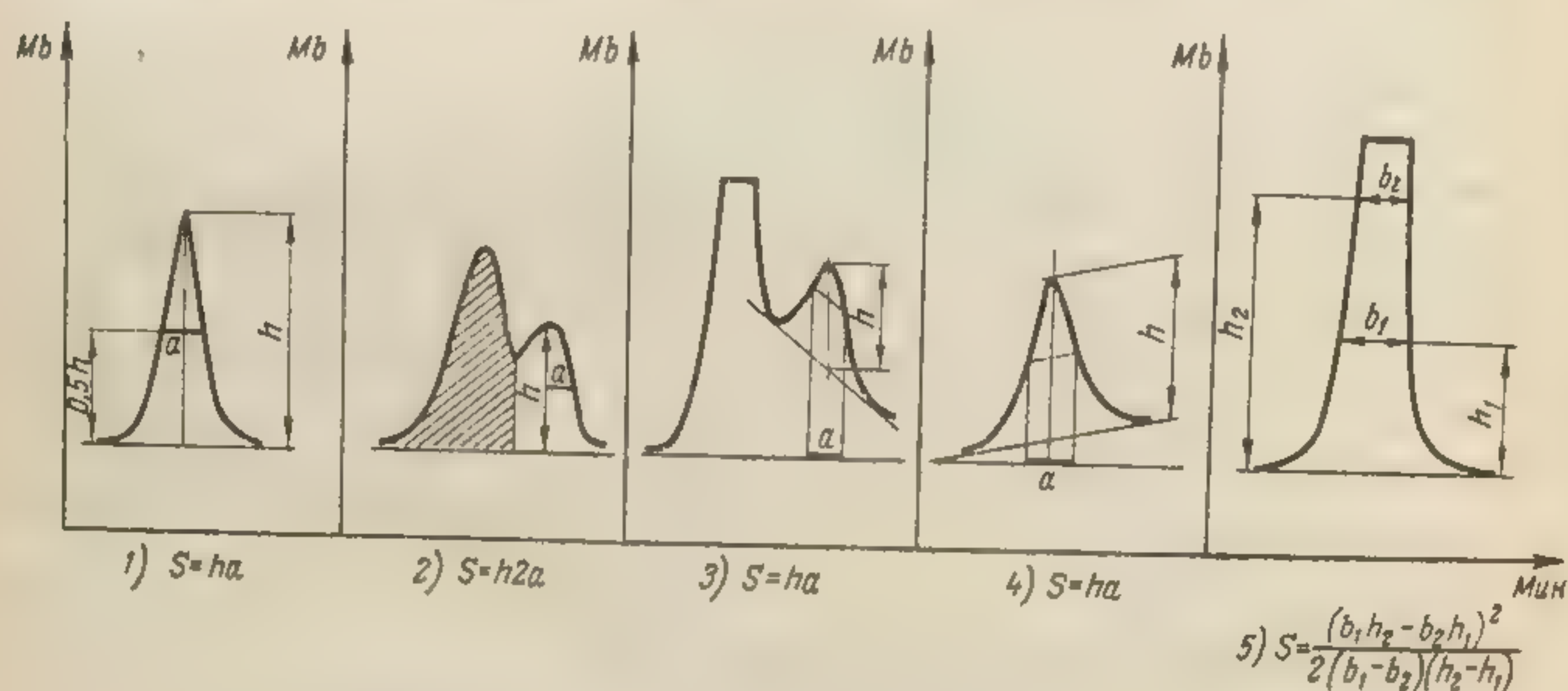


Рис. 7. Определение площадей хроматографических пиков:

1 — симметричных; 2 — частично перекрывающихся; 3 — малого пика примеси; 4 — при наклоне нулевой линии; 5 — зашкаленного

С наименьшей погрешностью может быть измерена площадь пиков, имеющих отношение высоты к ширине на середине высоты в пределах от 3 до 5. При площадях 25—50 мм² ошибка определения 15—30 отн.%, а при величине площади около 100 мм² — примерно около 10 отн.% и мало меняется при замене одного метода другим. Только для пиков, больших 100—200 мм², удастся определять площадь с точностью 1—3 отн.%. Поэтому для повышения точности хроматографического анализа скорость записи хроматограммы должна быть выбрана такой, чтобы площадь пиков была не менее указанных выше величин. Обычно скорость записи хроматограммы 300—600 мм/ч, однако при точных количественных работах возникает необходимость в увеличении ее до 1500—5000 мм/ч [122]

Площади пиков при неполном разделении можно считать равными площадям фигур, получающихся при опускании перпендикуляра из точки минимума на нулевую линию (на рис. 7, 2 одна из этих фигур заштрихована), и измерять их с помощью планиметра или миллиметровой бумаги.

Результаты такого метода расчета довольно точно соответствуют весовому составу смеси.

При расчете перекрывающихся пиков также можно опускать перпендикуляры из их максимумов и считать, что площадь каждого пика равна удвоенной площади его внешней, не затронутой перекрыванием части (рис. 7, 2).

Указанные способы расчета относятся к симметричным хроматографическим пикам. Перекрывающиеся несимметричные пики могут быть рассчитаны указанными способами только при отсутствии «хвостов» и при условии весьма незначительной асимметрии.

При определении площади малого пика примеси, находившегося на пологом заднем фронте большого пика основного компонента, т. е. на его «хвосте» (рис. 7, 3), наиболее точные результаты получают при непосредственном измерении площади малого пика, считая нулевой линией для него продолжение контура основного пика.

Этот случай тесно связан с проблемой определения площади пика, записанного при наклоне нулевой линии (рис. 7, 4).

В обоих случаях площадь пиков считают равной произведению высоты пика на проекцию его средней линии по направлению, перпендикулярному высоте, как показано на рис. 7, 3 и 7, 4.

Площадь зашкаленных (неполностью уложившихся) пиков можно рассчитать по формуле, как указано на рис. 7, 5.

Расчет состава смесей по хроматограмме. Основными методами расчета хроматограмм и получения количественных результатов являются методы внутреннего стандарта, внутренней нормализации и абсолютной калибровки [44, 131, 155, 158, 122].

Метод внутренней нормализации основан на определении соотношений между концентрациями компонентов смеси. Поэтому необходимым условием определения содержания какого-либо вещества в смеси является предположение, что элюируются все компоненты пробы и чувствительность детектора к каждому из них одинакова.

Сумму площадей всех пиков хроматограммы принимают за 100%, а площадь для каждого пика вычисляют в процентах общей площади. Расчет ведут по формуле

$$X_i = \frac{S_i}{\sum_{i=1}^n S_i} \cdot 100\%, \quad (25)$$

где X_i — процентное содержание i -того компонента;

S_i — площадь пика i -того компонента;

$\sum_{i=1}^n S_i$ — сумма площадей всех n -пиков.

Метод внутренней нормализации имеет то преимущество, что знание количества вводимой пробы не является обязательным, однако он не всегда дает точные и объективные данные.

Для получения достоверных результатов площади пиков, соответствующие разделенным компонентам, следует умножить на калибровочные коэффициенты, определяемые чувствительностью детектора к ним. Произведение площадей пиков и калибровочных коэффициентов дает величины приведенных площадей, которые используют для расчета внутренней нормализации:

$$X_i = \frac{K_i S_i}{\sum_{i=1}^n K_i S_i} \cdot 100\%, \quad (26)$$

где K_i — коэффициент, определяемый чувствительностью детектора к данному компоненту.

Метод абсолютной калибровки основан на использовании зависимости высоты или площади пика от количества соответствующего вещества в смеси. Эту зависимость определяют экспериментально, последовательно вводя в хроматограф различные, но точно измеренные количества изучаемого компонента, измеряют их площади (S_1, S_2, S_3 на рис. 8) и строят график в координатах: площадь пика — абсолютное количество введенного в колонку вещества. Затем разделяют точное количество смеси неизвестного состава и из графика по площади пика интересующего компонента (S_x) определяют его концентрацию в смеси.

Несмотря на высокую трудоемкость (дозирование строго определенных количеств представляет известные трудности), этот метод позволяет получить абсолютную, а следовательно, и наиболее объективную информацию. По этой причине методом абсолютной калибровки пользуются для проверки других способов количественной обработки хроматограмм. Этот метод является основным при анализе микропримесей, а также при определении одного или нескольких компонентов.

При решении практических вопросов большую часть сведений, даваемых методом абсолютной калибровки, можно получить с помощью значительно менее трудоемкого метода внутреннего стандарта.

Метод внутреннего стандарта основан на добавлении к пробе анализируемой смеси точно известного количества вещества, называемого «внутренним стандартом». Этот метод также известен под названием относительной калибровки. Вещество, используемое в качестве внутреннего стандарта подбирают так, чтобы пик его полностью отделялся от пиков компонентов исследуемой смеси, площадь была соизмерима с площадью остальных пиков и чтобы оно растворялось в анализируемой смеси.

Работа в
ные смеси с
следуемой п
их. Измеряя
нентам смеси
данного веще

где $S_{ст}$ и S_i
 $q_{ст}$ и q_i

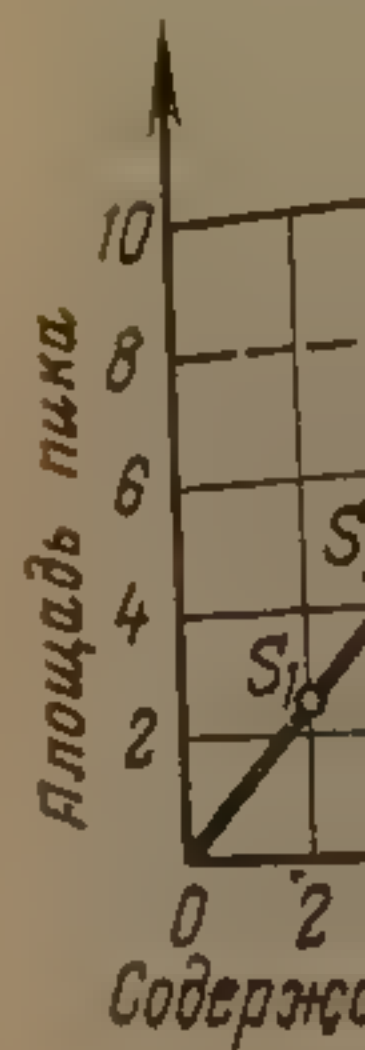


Рис. 8. Гра

Результ
рис. 9. За
чество ве
смеси. На
стандарта
 S_i и по ка
интересую
личество
определяе
Содерж
смеси мож

где K_i и

Работа ведется следующим образом. Составляют искусственные смеси с точным содержанием отдельных компонентов исследуемой пробы и внутреннего стандарта и хроматографируют их. Измеряют площади пиков, соответствующие данным компонентам смеси, и рассчитывают поправочный коэффициент для данного вещества по формуле

$$K = \frac{S_{ст} \cdot q_i}{S_i \cdot q_{ст}}, \quad (27)$$

где K — поправочный коэффициент данного вещества;
 $S_{ст}$ и S_i — площади пиков вещества-стандарта и исследуемого вещества;
 $q_{ст}$ и q_i — массы вещества-стандарта и исследуемого вещества в искусственной смеси.

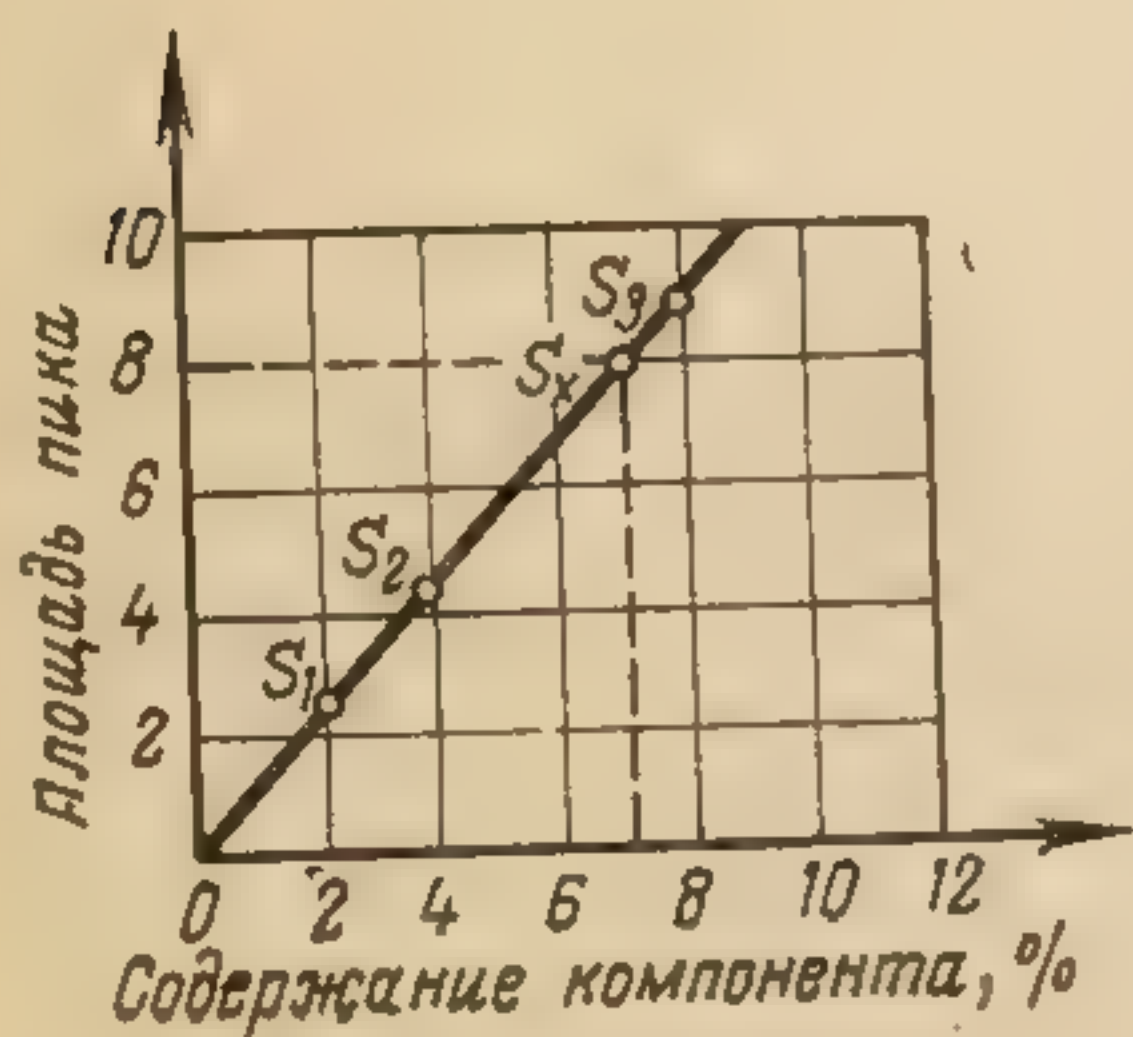


Рис. 8. График абсолютной калибровки

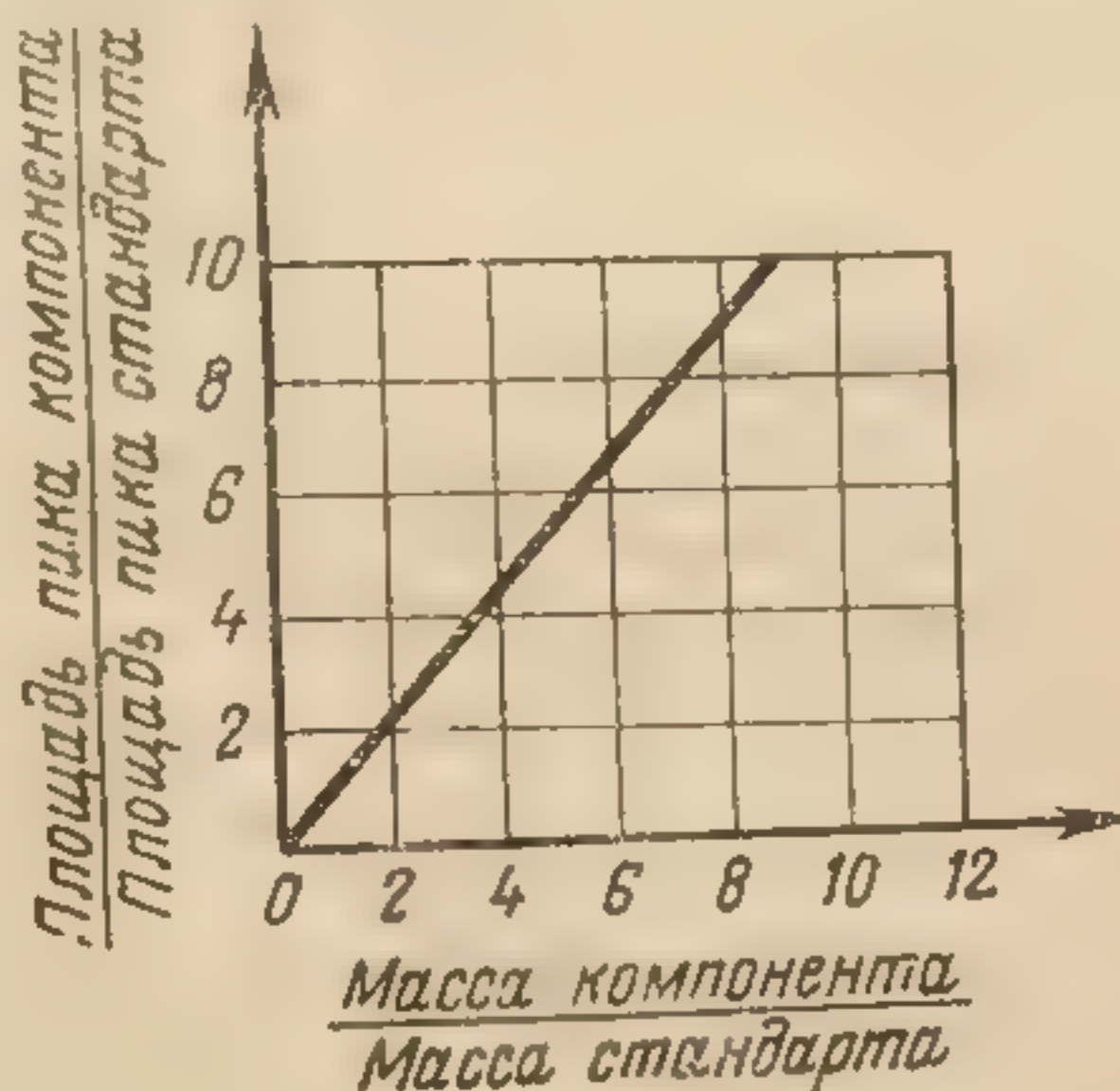


Рис. 9. График относительной калибровки (внутреннего стандарта)

Результаты можно выразить графически, как показано на рис. 9. Затем в анализируемую смесь вводят взвешенное количество вещества-стандарта и снимают хроматограмму этой смеси. На хроматограмме измеряют площадь пика вещества-стандарта ($S_{ст}$), площадь пика одного из исследуемых веществ S_i и по калибровочному графику определяют отношение массы интересующего вещества к массе вещества-стандарта. Зная количество вещества-стандарта, легко вычислить концентрацию определяемого компонента.

Содержание того или иного компонента в анализируемой смеси можно вычислить по формуле

$$X_i = \frac{K_i \cdot S_i}{K_{ст} \cdot S_{ст}} \cdot R \cdot 100\%, \quad (28)$$

где K_i и $K_{ст}$ — поправочные коэффициенты определяемого компонента и стандарта, связанные с природой детектора и характером вещества;

S_i и $S_{ст}$ — площади соответствующих пиков;

R — отношение массы внутреннего стандарта к массе анализируемой пробы.

Указанный метод позволяет проводить расчеты и в тех случаях, когда на хроматограмме отсутствуют пики некоторых компонентов анализируемой смеси. Добавление внутреннего стандарта до ввода пробы в хроматограф позволяет компенсировать ошибки, связанные с подготовкой пробы для анализа. На величину отношения площадей изменение чувствительности не оказывает влияния, поэтому нет необходимости вводить точные количества пробы и знать коэффициенты чувствительности детектора или иметь их постоянными. Пробу можно дозировать не точно, в этом случае количество отдельных компонентов (в мг) вычисляют по формуле

$$X_i = \frac{S_i}{S_{ст}} \cdot q_{ст}, \quad (29)$$

где $q_{ст}$ — количество введенного вещества-стандарта, мг.

Метод внутреннего стандарта получил большое распространение в практике ГХ как один из наиболее удобных способов получения количественной информации.

Для оценки точности хроматографических методик необходимо применять методы математической статистики. Вопросы их использования в практике количественного ГХ анализа подробно рассмотрены в нескольких работах [68, 131].

Методика проведения эксперимента

Для решения любой практической задачи по разделению смесей веществ необходимо прежде всего правильно приготовить колонку, так как именно в ней происходит действительное разделение компонентов смеси. Важнейшими факторами, от которых зависит достижение требуемого разделения, являются твердый носитель, тип и количество жидкой фазы, метод заполнения, длина и температура колонки.

Размеры колонки определяют общее количество газа и жидкости, которое будет находиться внутри нее, влияя на эффективность разделения. Поэтому для решения каждой конкретной задачи надо иметь колонку оптимальных размеров.

Как уже сообщалось, длина наполненных колонок может быть от нескольких десятков сантиметров до 16 м. Чем больше длина колонки, тем лучше разделение. Однако скорость газа-носителя изменяется при протекании его через колонку, поэтому при оптимальной скорости газа-носителя работает только небольшая часть колонки. В связи с этим на слишком длинных колонках разделение может быть ухудшено. К тому же при

работе с длинными колонками необходимо создавать очень высокие давления на входе, что может вызвать затруднения при вводе пробы и обеспечении герметичности. Чем меньше диаметр колонки, тем выше эффективность. Но с увеличением диаметра колонки возрастает допустимая величина пробы, которую можно ввести в нее. К сожалению, с увеличением диаметра колонки ее эффективность снижается.

Перед заполнением колонку сначала промывают разбавленной соляной кислотой (1:10), затем водой, ацетоном, эфиром, после чего сушат с помощью водоструйного насоса.

Как известно, количество жидкой фазы должно быть достаточным, для того чтобы покрыть частицы носителя тонким, равномерным слоем. При избытке жидкой фазы происходит накопление ее в промежутках между частицами, и эффективность колонки снижается. Для носителей на основе диатомовых земель эффективность резко падает при нанесении жидкой фазы в количествах, превышающих 30% массы (веса) носителя. Но слишком малое количество неподвижной фазы может привести к тому, что активные центры поверхности носителя окажутся непокрытыми пленкой жидкой фазы. Это может вызвать необратимую адсорбцию или разложение пробы. При выборе количества жидкой фазы необходимо также иметь в виду летучесть пробы. Вещества с низкой летучестью лучше разделяются на колонках с небольшим содержанием жидкой фазы — около 3—10%. Для соединений с высокой летучестью требуются большие количества жидкой фазы — до 20—30%.

Чтобы приготовить насадку колонки, рассчитывают необходимое для ее заполнения количество носителя по формуле

$$V = \pi r^2 l, \quad (30)$$

где V — объем носителя для заполнения данной колонки;
 r — внутренний диаметр колонки, см;
 l — длина колонки, см.

Количество носителя отмеривают цилиндром с некоторым избытком и взвешивают его в фарфоровой чашке на технических весах. Рассчитанное количество жидкой фазы (в процентах веса твердого носителя) взвешивают в стеклянном стаканчике на аналитических весах и растворяют в таком объеме растворителя, чтобы только смочить твердый носитель.

Полученный раствор жидкой фазы приливают к твердому носителю, находящемуся в фарфоровой чашке. Фарфоровую чашку со смесью держат на одной ладони под тягой, а другой рукой шпателем осторожно перемешивают смесь, чтобы не разрушить частицы твердого носителя. Необходимо обеспечить равномерное распределение жидкой фазы на твердом носителе. Смесь осторожно перемешивают до полного ее высушивания.

Фаза считается готовой, когда получится легкосыпучая масса без запаха растворителя.

Колонку засыпают наполнителем мелкими порциями при одновременном постукивании по ней легкими упругими ударами. После полного заполнения концы колонки закрывают плотно стеклянной ватой на глубину 8—12 мм, чтобы полностью исключить попадание твердых частиц из колонки в коммуникации и в детектор. Затем колонку скручивают в спираль таким образом, чтобы она соответствовала форме термостата хроматографа, где ее и устанавливают.

Перед анализами приготовленную колонку необходимо термически обработать в токе газа-носителя с целью удаления из нее летучих веществ и стабилизации неподвижной фазы. Температуру прогрева обычно устанавливают на 10—20°С выше той, при которой колонка будет работать, однако она должна быть ниже верхнего температурного предела для данной жидкой фазы. Необходимо помнить, что при продувке колонки детектор обязательно отсоединяют, чтобы избежать его загрязнения.

Одним из важных моментов в проведении хроматографического анализа является правильный выбор температуры колонки. При слишком низкой температуре вещества не будут элюироваться или будут давать очень широкие пики из-за продольной диффузии в газе-носителе в результате длительного пребывания в колонке. При слишком высокой температуре вещества выйдут без разделения (низкокипящие фракции). Поэтому необходимо выбрать некоторую промежуточную температуру, с тем чтобы добиться наилучшего разделения и регулировать ее в течение всего опыта.

При использовании большого количества жидкой фазы и фазы с большей удерживающей способностью требуется применение более высоких температур.

При выборе температуры колонки необходимо также иметь в виду максимальную и минимальную рабочие температуры используемой жидкой фазы. В случае превышения максимально допустимой температуры колонка выходит из строя.

Эффективность колонки зависит также от выбора линейной скорости газа-носителя, которая наиболее просто измеряется с помощью пенного измерителя и секундомера. Оптимальная скорость газа-носителя в колонке длиной 3 м и внутренним диаметром 3 мм обычно 30—50 мл/мин.

Очень важна методика ввода пробы в колонку, так как она влияет на форму хроматографических пиков: более узкие и симметричные пики получаются при введении проб небольшого объема и высокой концентрации. Для ввода жидких проб используют специальные микрошприцы объемом до 1 мкл либо обычный медицинский шприц.

Методика ввода жидкой пробы состоит в прокалывании самоуплотняющейся резиновой прокладки (на входе в испаритель

хроматогра...
ема исслед...
быстро. П...
(обычно л...
гой (бол...
чтобы ее п...
поршня и...
ного давл...
прокладку...
шень, спу...
пальцем)

Необхо...
достаточно...
ния проб...
быть доста...
цию или...
проверить...
дует ее ув...
шится ил...
что темпе...
резко изм...
форма, то...
зошла тер...

3.2.2. ОПРЕ

ГЖХ
става жи...
дов, выде...
нана стан...
ных кисл...
ненасыщ...
23, 31, 17

Так к...
ниями с...
хромато...
ловые эф...

Слож...
более н...
имеет р...
ность ра...
а данны...
лее точн...

Слож...
перезти...
стерино...
ных кис...

хроматографа) иглой шприца и введении определенного объема исследуемой пробы. Проба должна быть введена в колонку быстро. При этом шприц держат двумя руками. Одной рукой (обычно левой) направляют иглу в резиновую прокладку, а другой (большим пальцем правой руки) прикладывают усилие, чтобы ее проколоть, а также чтобы предотвратить выталкивание поршня из шприца, что может происходить за счет избыточного давления в хроматографе. Вводят иглу через резиновую прокладку как можно глубже в испаритель, нажимают на поршень, спустя 1—2 сек вынимают иглу (придерживая поршень пальцем) по возможности быстро и плавно.

Необходимо следить, чтобы температура испарителя была достаточно высокой для обеспечения большой скорости испарения пробы. С другой стороны, температура испарителя должна быть достаточно низкой, чтобы исключить термическую деструкцию или изменения строения анализируемого вещества. Чтобы проверить, правильно ли выбрана температура испарителя, следует ее увеличить. Если при этом эффективность колонки улучшится или пик станет более симметричным, то это означает, что температура испарителя была выбрана низкая. Если же резко изменится время удерживания, площадь пика или его форма, то температура испарителя слишком высока и произошла термическая деструкция.

3.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

ГЖХ является наиболее важным методом для изучения состава жирных кислот природных масел и жиров, а также липидов, выделенных из различных пищевых продуктов. ГЖХ признана стандартным методом исследования самых различных жирных кислот — от C_1 до C_{30} и выше, насыщенных, разветвленных, ненасыщенных, цис- и транс-изомеров, окси-, эпоксикислот [6, 23, 31, 176].

Так как липиды являются высокомолекулярными соединениями с относительно высокой температурой кипения, то для хроматографического разделения их обычно переводят в метиловые эфиры.

Сложные эфиры имеют более низкую температуру кипения и более низкую полярность, чем соответствующие кислоты, что имеет ряд преимуществ: достигается более высокая эффективность разделения при меньших температурах и времени анализа, а данные при идентификации и количественном определении более точны.

Сложные метиловые эфиры жирных кислот образуются при переэтерификации глицеридов, фосфолипидов, сложных эфиров стероидов, при непосредственном метилировании свободных жирных кислот, а также солей кислот [23, 31].

Выделение липидов

Методы выделения жира экстракцией в аппарате Сокслета и методы исчерпывающей экстракции не могут гарантировать неизменяемость качества сырого жира, который потом рискованно подвергать анализу для установления жирнокислотного состава.

При экстракции липидов настаиванием (в присутствии безводного сернистого натрия) хлороформом, четыреххлористым углеродом, петролейным эфиром и другими неполярными растворителями удаляются в основном триглицериды.

При исследовании липидов следует отдать предпочтение способам экстракции (по методам Фолча, а также Блая и Дайера) с использованием бинарных растворителей, например смеси хлороформа и метанола, с помощью которой выделяют из продуктов животного и растительного происхождения более 99% общих липидов [87, 50, 23]. Применение полярного растворителя в сочетании с неполярным позволяет разрушить липопротеиновые комплексы. Наиболее полная экстракция липидов достигается тогда, когда продукт гомогенизируют со смесью метанола и хлороформа в соотношении, при котором обеспечивается получение однофазной системы с водой, содержащейся в продукте. Добавляя в гомогенат избыток хлороформа и воду, получают двухфазную систему, которую легко разделить. Слой хлороформа содержит растворенные в нем липиды, нелипидные примеси в нем практически отсутствуют [87].

Заслуживает внимания метод экстракции, разработанный сотрудниками Института питания АМН СССР [50], с применением фильтрующей делительной воронки (ФДВ), которая может быть использована для любой экстракции типа твердое тело-жидкость, так как обеспечивает быстрое отделение экстракта от твердой фазы. Метод прост в исполнении, непродолжителен, не огнеопасен, обеспечивает проведение полной экстракции в «мягких» условиях, что позволяет использовать выделенный жир одновременно для оценки не только его количественного содержания, но и качественного состава.

Методика выделения жира в ФДВ заключается в следующем. 1—2 г продукта помещают в ФДВ с впаянным стеклянным фильтром № 2 или № 3, приливают 20 мл экстрагирующей смеси хлороформа и этанола, взятой в соотношении 2:1, и энергично встряхивают воронку, закрытую притертой пробкой, в течение минуты. Затем с помощью водоструйного насоса экстракт отбирают в приемник. Экстракцию аналогичным способом повторяют 3 раза. По окончании экстракции делительную воронку и приемник споласкивают 10 мл растворителя. Полученный экстракт можно использовать как для количественной, так и для качественной характеристики жира. Экстракт переносят в отгонную колбу и удаляют растворитель на ротаторном испарителе. Полученный жир используют для ГХ анализа.

Методы метилирования

Описанные в литературе способы получения метиловых эфиров жирных кислот можно разделить на группы: одностадийная переэтерификация глицеридов; двухстадийный метод с выделением свободных жирных кислот из жиров и масел и последующей их этерификацией; другие методы этерификации.

Переэтерификация (алкоголиз) глицеридов метанолом проводится в присутствии щелочных катализаторов—алкоголятов натрия, калия или едкого кали [23, 176], а также в присутствии кислых катализаторов—соляной кислоты [23], серной кислоты [239], треххлористого и трехфтористого бора [23], хлористого ацетила [32, 122]. Полученные метиловые эфиры обычно не выделяют и используют их раствор непосредственно для ГХ анализа.

При двухстадийном получении метиловых эфиров жиры и масла предварительно омыляют спиртовой щелочью, выделяют свободные жирные кислоты и затем этерифицируют их [23, 176]. Однако во время омыления могут изомеризоваться полиненасыщенные жирные кислоты. Поэтому особое значение придают температуре и продолжительности реакции.

Для метилирования свободных жирных кислот пригодны все условия переэтерификации, кроме того, широко используют диазометан [23, 176]. Предложен метод этерификации жирных кислот на ионообменной смоле, который подробно рассмотрен на стр. 151—152.

Среди других методов получения метиловых эфиров можно отметить их синтез из нерастворимых серебряных солей жирных кислот, которые обрабатывают иодистым метилом. Этот метод используют обычно для анализа дикарбоновых кислот.

Таким образом, метиловые эфиры кислот получают с помощью абсолютного метанола. Очистку (абсолютирование) метилового спирта проводят следующим образом. 200 г металлического иода растворяют в 30 мл метанола, добавляют 2,5 г стружки магния и нагревают до полного растворения в колбе емкостью 1 л с обратным холодильником. Затем добавляют 500 мл метанола, нагревают 30 мин и перегоняют с елочным дефлегматором, отбрасывая первые 25 мл дистиллята и отбирая фракцию с температурой кипения 64—65° С.

Ниже описываются некоторые методы приготовления метиловых эфиров жирных кислот, требующие относительно небольшого времени и позволяющие работать как с макро-, так и с микроколичествами жиров.

Переэтерификация метанолом, содержащим 5% хлористого водорода [23]. 200 мг липидов помещают в круглодонную колбу емкостью 100 мл, снабженную обратным холодильником с хлор-

кальцевой трубкой, добавляют около 40 мл абсолютного метанола, содержащего 5% (по весу) хлористого водорода и около 10 мл перекисанного бензола. Смесь кипятят на водяной бане в течение 2 ч, разбавляют двойным количеством воды, отделяют бензольный слой в делительной воронке, нейтрализуют его твердым бикарбонатом натрия, промывают и фильтруют через бумажный фильтр.

Переэтерификация метанолом на холоде в присутствии серной кислоты [239]. 100 мг липидов растворяют в 10 мл этилового эфира. При перемешивании с помощью магнитной мешалки по каплям добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты. Через 20 мин приливают 12 мл абсолютного метанола и выдерживают 20 мин. Для нейтрализации кислоты прибавляют 7 мл 35%-ного метанольного раствора едкого кали и оставляют на 15—20 мин.

Метилловые эфиры жирных кислот экстрагируют гексаном, для чего смесь с 40 мл гексана переносят в делительную воронку, прибавляют 80 мл воды и сильно встряхивают в течение минуты; нижнюю водную фазу удаляют; так повторяют три раза. Объединенные гексановые экстракты сушат над прокаленным сульфатом натрия, фильтруют и удаляют растворитель на роторном испарителе в вакууме.

Полученные метилловые эфиры можно очистить, используя тонкослойную хроматографию. На пластинку (18×24 см) с закрепленным слоем силикагеля наносят метилловые эфиры (около 100 мг), растворенные в петролейном эфире, и проявляют в системе петролейный эфир-этиловый эфир (19:1). Затем пластинку высушивают, и край ее (основную часть пластинки закрывают стеклом) обрызгивают 20%-ным спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты. Фракцию метилловых эфиров счищают с пластинки и элюируют трехкратно смесью петролейный эфир-этиловый эфир.

Переэтерификация метанолом в присутствии хлористого ацетила [122]. 25—30 мг (одну каплю) масла помещают в круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником с хлоркальцевой трубкой, добавляют 0,2 мл абсолютного метанола, 3—4 капли безводного хлористого ацетила, кипятят на водяной бане в течение часа, охлаждают и упаривают в течение 20—30 мин на роторном испарителе при комнатной температуре до удаления хлористого водорода. Образовавшуюся смесь метилловых эфиров жирных кислот разбавляют бензолом и пробу вводят в хроматограф.

Хроматографическое разделение на неполярных фазах

Наиболее распространенными неполярными фазами, используемыми при анализе метилловых эфиров жирных кислот, являются высококипящие вакуумные смазки кремнийорганической или

парафиновой природы — силикон-SE-30, апиезон-L, апиезон-M, полибутен. Основным фактором, определяющим разделение смесей на этих фазах, является молекулярный вес компонентов. Эти фазы обеспечивают полное разделение эфиров n-насыщенных кислот, различающихся по длине цепи на один атом углерода в пределах от C_1 до C_{34} .

Эфиры кислот с разветвленной цепью продвигаются по колонке быстрее неразветвленных с тем же числом углеродных атомов; изоформы кислот вымываются быстрее антезиоформ тех же кислот.

Ненасыщенные кислоты на этих фазах элюируются из колонки перед соответствующими насыщенными кислотами, но полностью разделить их по числу двойных связей на неполярных фазах не удается.

Апиезон-L обеспечивает разделение сложных эфиров по числу углеродных атомов, при этом насыщенные и мононенасыщенные разделяются полностью, ди- и триненасыщенные образуют смешанный пик на хроматограмме.

Силикон-SE-30 более устойчив при высоких температурах, но селективность его ниже: разделяются только насыщенные кислоты; ненасыщенные с одним и тем же числом углеродных атомов дают один пик. Этот факт может иметь и преимущество при отделении полностью насыщенных кислот от ненасыщенных компонентов.

Неполярные жидкие фазы с успехом применяются для разделения геометрических изомеров кислот, образующихся при гидрировании жира, а также предварительного фракционирования метиловых эфиров кислот по числу углеродных атомов для сравнительной идентификации.

Хроматографическое разделение на полярных фазах

Для разделения кислот по числу двойных связей используют в качестве неподвижной фазы полярную жидкость. В качестве такой жидкости применяют различные полиэфиры. На этих фазах моно-, ди-, триненасыщенные и т. д. эфиры выходят из колонки вслед за насыщенными с тем же числом атомов углерода. Следовательно, на полярных полиэфирных колонках можно разделить диеновые, триеновые, гексаеновые, пентаеновые и т. д. кислоты.

Эфиры разветвленных насыщенных кислот располагаются впереди соответствующих насыщенных эфиров с прямой цепью (как и в случае неполярных фаз).

Эфиры кислот, отличающиеся по расположению двойной связи в цепи, а также цис- и транс-изомеры плохо делятся на заполненных сорбентом колонках, но могут быть разделены при использовании капиллярных колонок.

При анализе метиловых эфиров жирных кислот растительного и животного происхождения, различающихся по длине цепи от C_1 до C_{30} и числу двойных связей от 1 до 6, наилучшие результаты дало применение следующих полиэфирных фаз: полиэтиленгликольадипината-ПЭГА (хорошо разделяет линолеат, линоленат и олеат), полиэтиленгликольсукцинната-ПЭГС (также разделяет все кислоты, включая кислоты с двойными связями), бутандиолсукцинната, который по свойствам аналогичен полиэфирам адипиновой и янтарной кислот, но дает более четкое разделение эфиров стеариновой и олеиновой кислот.

При анализе жирных кислот колонки с апиезонами и полиэфирами дополняют, а не заменяют друг друга. Апиезоны и другие неполярные фазы обеспечивают разделение по температурам кипения, а кроме того, позволяют различить цис- и транс-конфигурации и установить положение двойной связи в углеродной цепи. Полиэфиры обеспечивают разделение по числу атомов углерода, но их основной задачей является разделение ненасыщенных эфиров, моноенов, диенов, триенов и т. д.

Для эффективного разделения и точности количественного определения жирных кислот необходимо правильно выбрать рабочую температуру и регулировать ее в течение всего опыта. Температурный режим зависит от состава метиловых эфиров пробы и химической природы жидкой фазы.

При разделении эфиров кислот на неполярных фазах наилучшие результаты получаются при температурах $250-300^\circ C$, а на полярных — до $200-210^\circ C$, так как большинство полиэфиров содержит летучие соединения и термически неустойчиво при температурах выше $250^\circ C$.

Качественный и количественный анализ жирных кислот

Наиболее простой метод качественной идентификации неизвестной смеси жирных кислот — по относительной величине времени (объема) удерживания. Имеется большое число опубликованных таблиц со значениями относительных величин удерживания метиловых эфиров жирных кислот на различных фазах при различных температурах [23, 176].

На практике обычно поступают следующим образом. ГХ-разделению подвергают смесь эфиров известных жирных кислот и строят график в координатах: логарифм относительного времени (объема) удерживания ($\lg V_R^{\text{отн}}$) — число углеродных атомов в цепи (см. рис. 6). Сравнивая затем $\lg V_R^{\text{отн}}$ анализируемой смеси кислот со значениями $\lg V_R^{\text{отн}}$ на графике для стандартной смеси, идентифицируют состав исследуемой пробы. В качестве стандартной смеси можно использовать масла известного жирнокислотного состава, например подсолнечное, хлопковое, льняное.

По четкости разделения на полиэфирной фазе метиловых эфиров стеариновой и олеиновой кислот судят об эффективности приготовленной колонки.

Для определения строения жирных кислот в сочетании с ГЖХ рекомендуется использовать озонолиз, окислительное расщепление, гидрирование, спектроскопию в ИК-, УФ-областях, масс-спектрометрию, тонкослойную, колоночную и другие виды хроматографии [140, 175]. Так, для определения ненасыщенных кислот в исследуемой пробе ее часто подвергают гидрированию, переводя при этом ненасыщенные соединения в насыщенные с тем же числом углеродных атомов и, следовательно, изменяя их время удерживания. Разделяя смеси до и после гидрирования, можно идентифицировать и количественно определять ненасыщенные кислоты.

ГХ позволяет проводить количественные определения насыщенных и ненасыщенных кислот с большей точностью и быстрее, чем любой другой химический метод. Мерой количества жирных кислот также служит относительная площадь соответствующего пика на хроматограмме, для расчета которой чаще всего используют метод внутреннего стандарта и внутренней нормализации. При количественной интерпретации хроматограмм необходимо учитывать систему детектирования.

Анализ жирнокислотного состава пищевых продуктов

Имеется значительное количество фактических данных по ГХ-исследованию жирных кислот в продуктах животного и растительного происхождения [41, 113, 183, 188, 204, 244, 117].

На рис. 5 (см. стр. 58) представлена хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот льняного масла, полученная на приборе ЛХМ-8М с ПИД при следующих условиях разделения: колонка длиной 2,5 м и внутренним диаметром 3 мм заполнена 20% ПЭГС на хромосорбе W зернением 60—80 меш; скорость газа-носителя (азота) 40 мл/мин; температура колонки 185°С, а испарительной камеры 250°С.

Анализ жирных кислот рыбьего жира представляет определенные трудности по сравнению с анализом жирных кислот растительных масел в связи с наличием высокомолекулярных кислот с длиной цепи до 24—26 углеродных атомов, имеющих до 6 двойных связей, а также изокилот с нечетным числом атомов углерода.

На рис. 10 показана хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот жира печени трески, полученная на хроматографе «Шимадзу», детектор ПИД двухпламенный. Условия разделения следующие: колонка (двухколоночная система) из нержавеющей стали, длиной 4,5 м и внутренним диаметром 3 мм, наполнена 8% 1,4-бутандиолсукцинат на хромосорбе W (60—80 меш); температура колонки 195°С; скорость газа-носителя (азота)

52 мл/мин; давление на входе 1,95 кгс/см²; продолжительность анализа 45 мин [41].

При качественной идентификации рекомендуется применять смеси метиловых эфиров жирных кислот жира печени трески, состав которой уже хорошо изучен (поскольку очищенные препараты полиненасыщенных кислот труднодоступны), использовать графические зависимости логарифма времени удерживания от числа углеродных атомов в цепи кислот, а также предвари-

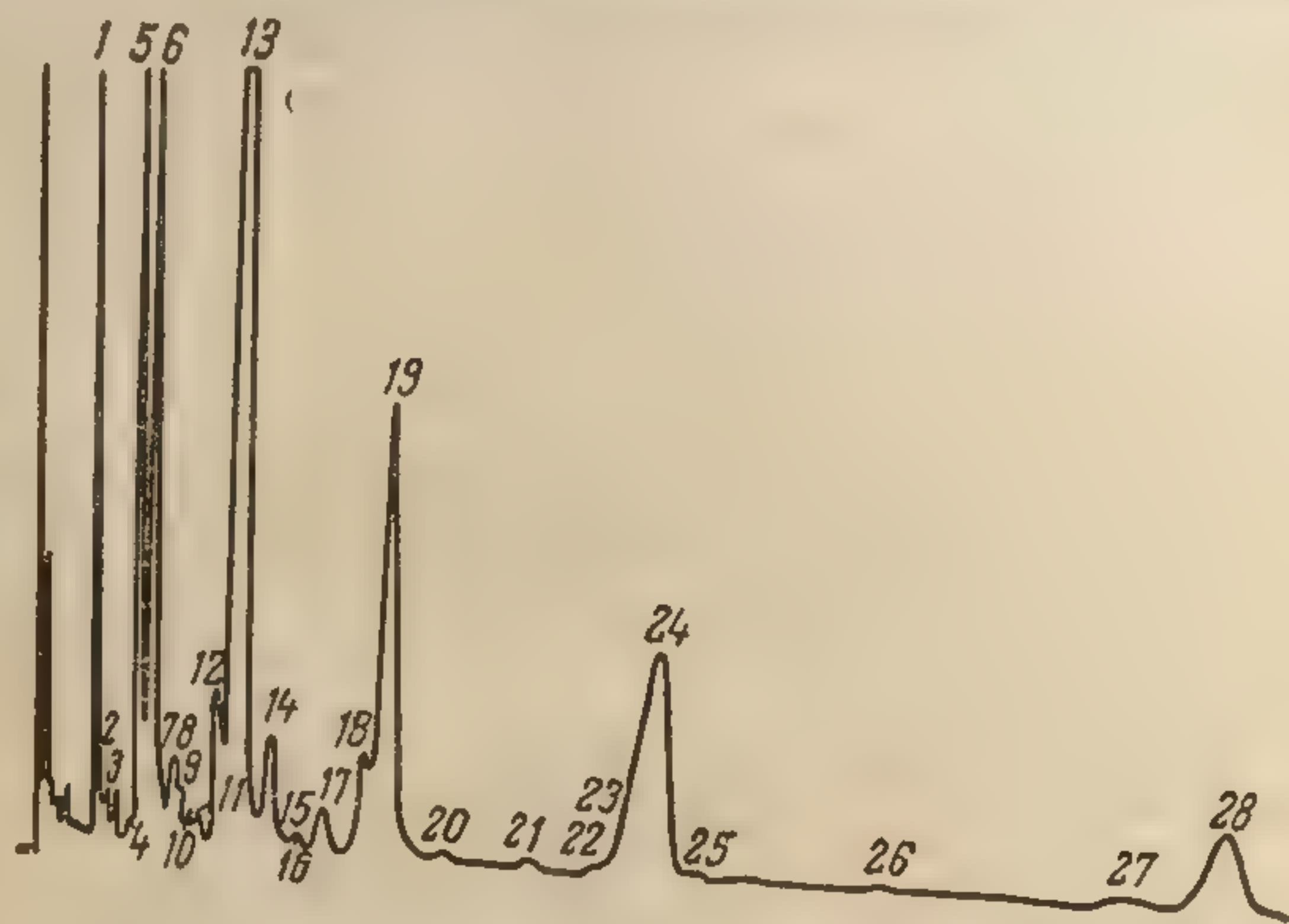


Рис. 10. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот жира печени трески, пики:

1—C₁₄; 2—C₁₄:1; 3—C₁₅; 4—C₁₅:1; 5—C₁₆; 6—C₁₆:1ω9; 7—C₁₆:2ω7;
8—C₁₇; 9—C₁₆:2ω4; 10—C₁₇:1; 11—C₁₆:3ω4; 12—C₁₈; 13—C₁₈:1ω9;
14—C₁₈:2ω6; 16—C₁₈:3ω6; 17—C₁₈:3ω3; 18—C₁₈:4ω3; 19—C₂₀:1ω9;
20—C₂₀:2ω6; 21—C₂₀:4ω6; 22—C₂₀:4ω3; 23—C₂₂:1ω11; 24—C₂₀:5ω3;
25—C₂₂:2ω9; 26—C₂₂:3ω6; 27—C₂₂:5ω3; 28—C₂₂:6ω3; 15—не идентифицированы (индекс ω означает концевую углеродную цепь)

тельно фракционировать смесь по степени ненасыщенности в тонком слое силикагеля, импрегнированного серебром [41].

При анализе молочного жира, отличающегося содержанием летучих низкомолекулярных кислот, рекомендуется проводить метилирование с помощью диазометана (чтобы избежать их потерь) или готовить менее летучие этиловые или бутиловые эфиры кислот [31].

Поскольку смеси кислот молочного жира имеют широкий диапазон температур кипения, разделение их следует осуществлять в условиях автоматического программирования температуры или в капиллярной колонке. При отсутствии специальной аппаратуры можно использовать работу колонки при разных температурах [16, 171]. Так, удовлетворительное разделение метиловых эфиров жирных кислот сливочного масла достигнуто на хроматографе «Цвет-3-66» с ПИД при двух режимах: при

50°С и скорости газа-носителя (азота) 60 мл/мин (для разделения кислот C_4-C_8), а также при 200°С и скорости азота 120 мл/мин (для кислот C_8-C_{18}), на колонке длиной 1 м и внутренним диаметром 4 мм, с использованием полярной и неполярной НЖФ (20% апиезона-*L* на хромосорбе *W* зернением 60—80 меш и 10% 1,4-бутандиолсукцината на хромосорбе *W*) — [171].

Результаты анализа улучшаются при предварительной разгонке метиловых эфиров жирных кислот на фракции (например, метод тонкослойной хроматографии, вакуумной дистилляции) с последующим анализом каждой фракции при оптимальной для нее температуре [29].

3.2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Летучие жирные кислоты влияют на вкусовые достоинства пищевых продуктов. Они присутствуют в большинстве продуктов растительного и животного происхождения в свободном состоянии или в виде эфиров. Летучие жирные кислоты могут быть насыщенными и ненасыщенными, иметь прямую и разветвленную цепи, четное и нечетное число атомов углерода.

Для разделения летучих кислот и количественного их определения наиболее целесообразным методом является ГЖХ, поскольку она позволяет анализировать даже такие близкие изомеры, как капроновая и изокапроновая кислоты, без заметного перекрывания пиков. Метод разделения летучих кислот колоночной распределительной хроматографией на силикагеле, предложенный Харпером и с успехом применявшийся долгое время, предполагает длительную и тщательную подготовку колонки, к тому же этим методом не обнаруживается муравьиная кислота. Эффективного разделения летучих жирных кислот добиваются на ГХ при программированном повышении температуры колонки [75].

Низкомолекулярные кислоты можно хроматографировать не только в виде эфиров, но и в виде свободных кислот [23]. Но чтобы избежать асимметрии выходящих пиков, что по-видимому связано с ассоциацией молекул или адсорбцией их на носителе, носитель обрабатывают кислотой [156]. Деление неэтерифицированных кислот не дает возможности получить на хроматограммах пик муравьиной кислоты, так как ПИД не чувствителен к этой кислоте.

Представляет интерес метод ГХ-разделения в реакционном варианте в виде этиловых эфиров, которые получают непосредственно в месте ввода пробы в хроматограф. Этот метод имеет то преимущество, что этиловые эфиры, образовавшиеся в результате мгновенной реакции между солями летучих кислот и этиленсульфаткалнем, поступают в колонку без каких-либо потерь [14, 88].

Определение летучих жирных кислот в сыре и сливочном масле

Метод основан на выделении летучих жирных кислот из продукта путем дистилляции, концентрации их, перевода в метиловые эфиры (этерификацию проводят в присутствии олеума в термостате при 38—40° С в течение 2 ч) и ГХ-разделении [92, 165].

Условия разделения следующие: колонка из нержавеющей стали, длиной 1,2 м и диаметром 6 мм, наполнена 10 % ПЭГА на носителе Risorb BLK размером 0,20—0,315 мм; температура колонки 110° С, а испарителя 130° С; детектор ПИД; скорость газа-носителя (азота) 20 мл/мин; скорость движения ленты самописца 5 мм/мин.

Для разделения метиловых эфиров жирных кислот отбирают медицинским тубиркулиновым шприцем газовую фазу в количестве 0,8—1 мл, устанавливают необходимый точный объем и через иглу шприца вводят в колонку. Пики метиловых эфиров жирных кислот располагаются в следующем порядке: муравьиной, уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой, капроновой. Количество летучих жирных кислот рассчитывают по соотношению величин пиков кислот стандартных растворов («свидетелей») и исследуемого продукта.

Определение летучих жирных кислот мяса

Метод основан на экстракции летучих кислот из мяса органическими растворителями (этанолом и ацетоном) с последующим выделением на ионообменной смоле (амберлит) ИРА-400 в ОН-форме и ГХ разделения в свободном виде [111].

Выделение кислот. Навеску мяса, дважды измельченную на мясорубке, экстрагируют 70%-ным этанолом в соотношении 1 : 2 в течение часа на встряхивающей машине, а затем ацетоном в соотношении 1 : 1 в течение 30 мин. Оба экстракта фильтруют через обычный фильтр и пропускают через колонку, заполненную ионообменной смолой ИРА-400 в ОН-форме (из расчета 100 г влажного аннионита на 500 мл экстракта), со скоростью 0,5 мл/мин. Элюацию кислот с аннионита производят 10%-ным раствором щелочи. Полученный элюат концентрируют до объема 10 мл, нейтрализуют концентрированной соляной кислотой до pH 2 и извлекают кислоты хлористым этилом и бензолом. После удаления хлористого этила (при 20° С) пробу используют для ГХ анализа.

Хроматографирование. Выделенные в свободном виде жирные кислоты подвергают ГХ-разделению на колонке с модифицированным носителем. Условия анализа: колонка длиной 1,3 м и диаметром 3 мм, которая наполнена 15% этиленгликольизофталата на целите-545 (60—80 меш), обработанном серной кис-

лотой; скорость газа-носителя (водорода) 2 л/ч; температура колонки 135° С, а испарительной камеры 250° С.

Летучие жирные кислоты идентифицируют с помощью стандартной смеси кислот по времени удерживания и по положению пиков. Для количественных определений кислот в качестве стандарта используют изовалериановую кислоту. В мышечной ткани свинины идентифицированы и количественно определены уксусная, пропионовая, масляная, валериановая, изокапроновая, капроновая и гептановая кислоты.

Определение летучих жирных кислот в колбасных изделиях методом реакционной хроматографии

Метод основан на выделении летучих жирных кислот из продукта и ГХ-разделении в реакционном варианте в виде этиловых эфиров [88].

Из колбасных изделий летучие жирные кислоты выделяют в вакуумном аппарате путем улавливания в ловушках 0,1 н. раствором КОН. Полученные калийные соли кислот высушивают в эксикаторе над пятиокисью фосфора и затем тщательно растирают с равным количеством этиленсульфата калия. Полученную смесь солей помещают в стеклянный капилляр, запаянный с одного конца (из молибденового стекла, внутренним диаметром 1,5 мм, длиной 100 мм, толщиной стенки 0,25 мм), который соединяют с помощью резинового ниппеля с иглой и вводят в хроматограф. Капилляр нагревают пламенем спиртовой горелки в течение 10 сек. При этом происходит мгновенная реакция этерификации, и образовавшиеся этиловые эфиры поступают в колонку без потерь. Для их разделения наиболее подходящей жидкой фазой является динониловый эфир фталевой кислоты (16%) на целите-С-22 (80—100 меш) и ПЭГС на целите-545 (80—100 меш) — [88], а также смесь 25% этиленгликольадипата, 2% фосфорной кислоты и 3% борной кислоты на целите-545 [14].

3.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕСТИЦИДОВ

В анализе ядохимикатов большое распространение получила ГЖХ [93, 73, 143]. Этим методом могут быть разделены почти все пестициды, а применение высокочувствительных и избирательных детекторов делает возможным определение даже миллионных долей препарата.

Ядохимикаты извлекают из навески средней пробы продукта органическими растворителями (бензол, гексан, хлороформ, эфиры и т. п.) или их смесями, реже водой, так как большинство пестицидов плохо в ней растворяется. При экстракции почти всегда наряду с пестицидами извлекаются пигменты, жиры и другие вещества, мешающие точности определения.

поэтому экстракт очищают от сопутствующих веществ методами колоночной и тонкослойной хроматографии, перераспределением в другом растворителе, смешиванием с обезвоженной серной кислотой и другими способами. Очищенный экстракт подвергают ГХ-разделению. Чтобы свести к минимуму затраты труда на выделение пестицидов из пищевых продуктов, проводятся исследования [73] по разработке избирательных детекторов.

При анализе остатков ядохимикатов применяют ионизационные детекторы, обладающие чувствительностью 10^{-6} — 10^{-9} г, а также детекторы по захвату электронов. В качестве НЖФ используют силиконовые масла, апиэзоновые смазки, силиконовые полимеры, модифицированные фторсодержащими и нитрильными группами. Для более надежной идентификации необходимо повторно проводить разделение на фазах разной полярности, применять разные способы детектирования, учитывая, что детектор по захвату электронов реагирует на галоидосодержащие соединения, термоионный — чувствителен к фосфорсодержащим. Компоненты, выходящие из колонки, можно определять методом люминесценции. В качестве сравнения для хлорорганических пестицидов используют время удерживания альдрина [93] или γ -изомера гексахлорана [73], для серосодержащих — сульфон, для фосфорорганических — паратион.

При количественном определении пестицидов чаще применяют метод абсолютной калибровки, или внутреннего стандарта.

Определение хлорорганических ядохимикатов в овощах, фруктах, молоке и продуктах его переработки

Метод основан на извлечении препаратов (альдрин, гексахлоран, гептахлор, ДДТ, ДДД, ДДЭ и др.) экстракцией органическими растворителями, очистке экстрактов путем распределения между двумя несмешивающимися жидкостями с последующей очисткой на колонке из окиси алюминия и разделении на хроматографе с детектором по захвату электронов [93].

Экстракция препаратов и очистка экстрактов. 25 г измельченных яблок экстрагируют 100—150 мл серного эфира при встряхивании в течение 15 мин. Экстракт упаривают досуха, прибавляют предварительно охлажденную до 5° — 0° С смесь ацетона с водой (4:1), и раствор быстро фильтруют. К фильтрату добавляют 24 мл гексана, водный слой удаляют, а гексановый сушат над безводным серноокислым натрием, испаряют до объема 1—2 мл и вносят в колонку с окисью алюминия безводной или II степени активности (высота слоя сорбента 7—8 см, на который насыпан слой в 3—4 см безводного серноокислого натрия). Ядохимикаты элюируют из колонки 100 мл смеси, состоящей из 10 мл эфира и 90 мл н-гексана, со скоростью 3—4 капли в секунду. Элюат упаривают до небольшого объема и количественно переносят в мерную пробирку. Объем раствора

не должен превышать 1—1,5 мл. Для ГХ-анализа используют 2—4 мкл этого раствора.

К 40 мл молока добавляют 80 мл ацетона, 80 мл н-гексана и встряхивают в конической колбе в течение 3 мин. Смесь переносят в центрифужный стакан, обмывая колбу 10 мл гексана и 5 мл воды, и центрифугируют при скорости 2500 об/мин в течение 3 мин. Слой гексана отделяют, высушивают 8—10 г безводного сернокислого натрия, декантируют и упаривают до объема 5—10 мл. Этот раствор количественно переносят в делительную воронку, прибавляют 15—30 мл диметилформамида или ацетонитрила, насыщенного гексаном (в соотношении 1:2), и встряхивают в течение минуты. После этого дают разделиться слоям и переносят диметилформамидный или ацетонитрильный слой в другую делительную воронку, в которой находится 350—400 мл раствора сернокислого натрия и 50 мл гексана для раствора в диметилформамиде или 350—400 мл насыщенного раствора хлористого натрия и 50 мл гексана для раствора в ацетонитриле. Воронку переворачивают 3—4 раза и после разделения слоев гексановый удаляют, а водный слой экстрагируют еще раз 50 мл гексана. Гексановые фракции объединяют, промывают 100 мл дистиллированной воды, упаривают до объема 2—3 мл. Этот раствор подвергают очистке на колонке с окисью алюминия и далее поступают так, как описано для пробы яблок.

Хроматографирование. Условия разделения следующие: колонка (стальная или стеклянная) длиной от 1,5 до 2 м и диаметром от 3 до 6 мм наполнена 10% SE-301 (или SE-30, или ДС-200, или ДС-11) на хромосорбе W зернением 60—80 меш (обработанном соляной кислотой); температура колонки 200°C, детектора 200°C, испарительной камеры 220°C; скорость азота 120 мл/мин; напряжение и чувствительность устанавливают таким образом, чтобы сила тока в ячейке детектора была $1,6 \cdot 10^{-10}$ А.

На рис. 11 приведены хроматограммы смеси ядохимикатов и пробы молока.

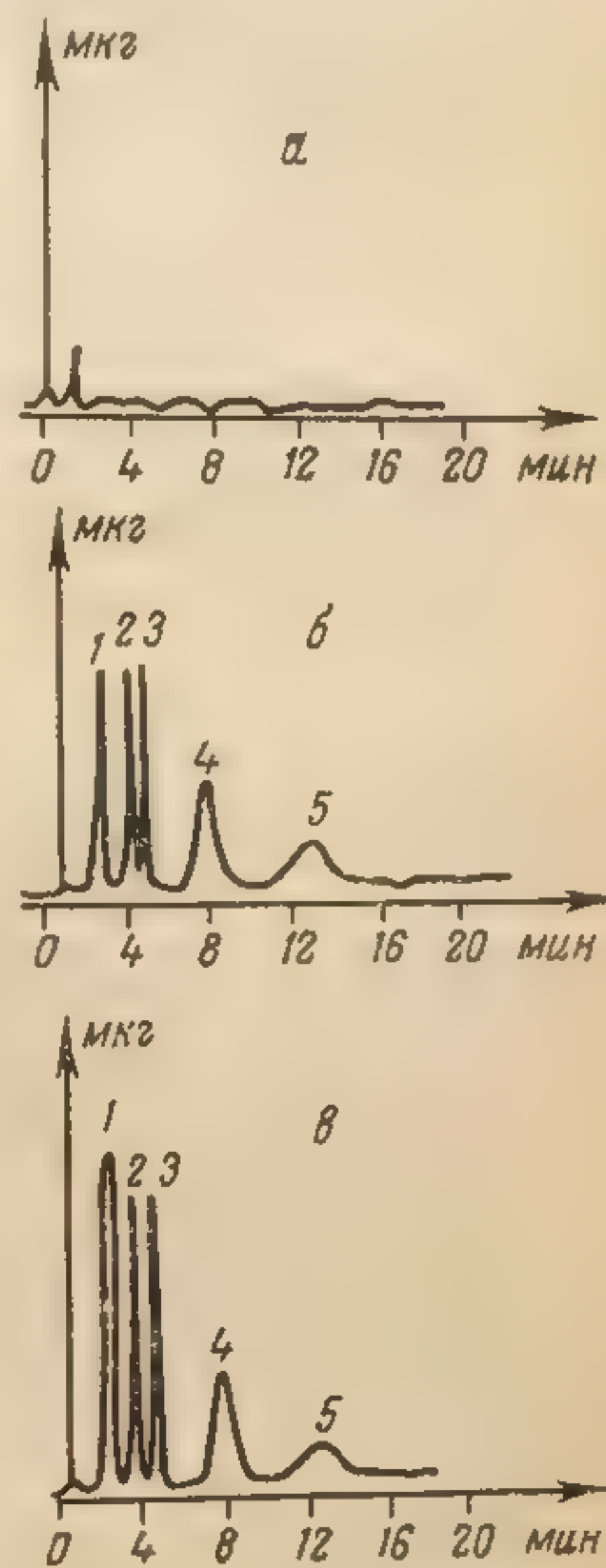


Рис. 11. Хроматограммы:

а — контрольной пробы молока; б — пробы молока с заданными количествами ядохимикатов; в — стандартного раствора, содержащего по 0,01 мкг ядохимикатов — линдана (1), гептахлора (2), альдрина (3), 4,4-ДДЭ (4), 4,4'-ДДТ (5)

Для количественного анализа определенное количество (2—5 мкл) стандартного раствора, который содержит 0,01—0,025 мкг ядохимиката, разделяют в таких же условиях, что и пробу. Расчет количества ядохимиката (в мг/л или мг/кг) в продукте ведут по формуле

$$X = \frac{A \cdot S_2 \cdot V_2}{S_1 \cdot V_1 \cdot V_3}, \quad (31)$$

где A — количество ДДТ в стандартном растворе, мг;
 S_1 — площадь пика стандартного раствора ДДТ, мм²;
 S_2 — площадь пика пробы, мм²;
 V_1 — объем экстракта пробы, введенный в хроматограф, мл;
 V_2 — общий объем экстракта после упаривания, мл;
 V_3 — навеска анализируемой пробы, л или кг.

3.2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ

Метод ГЖХ применим для определения жирорастворимых витаминов [145, 213, 153, 168, 243, 242]. В литературе имеются сообщения об удачном разделении витаминов в виде триметилсилильных (МТС) производных [243, 242], а также о возможности идентификации витаминов, растворимых в воде [168]. Более широко метод ГЖХ используется для определения качественного и количественного состава изомерных форм токоферолов (α , β , γ).

Определение изомерных форм токоферола в растительных маслах

Метод основан на омылении масла, выделении токоферолов из неомыляемых веществ и разделении их методом ГЖХ [145, 213, 153].

5 г масла омыляют 50 мл 10%-ного спиртового раствора КОН в присутствии пирогаллола при 85°С в течение часа. Неомыляемую фракцию экстрагируют этиловым эфиром (3 раза по 45 мл). Экстракт отмывают водой от щелочи до получения в присутствии фенолфталеина бесцветных промывных вод и сушат над безводным сернистым натрием. После фильтрации растворитель отгоняют. Для освобождения от каротиноидов высушенный остаток растворяют в 10 мл бензола, пропускают через адсорбционную колонку с диатомитом (высота слоя 30 см) и промывают колонку 15—20 мл бензола.

Полноту вымывания токоферолов контролируют по окрашиванию капли фильтрата раствором ортофенантролина и хлорного железа. Бензол отгоняют на ротонном испарителе, остаток растворяют в горячем метаноле и оставляют на 24 ч в холодильнике при —10°С для вымораживания стеролов. Стероиды отделяют фильтрацией на холоду, фильтрат концентрируют на ротонном испарителе.

Разделяют токоферолы на аргоновом хроматографе с ионизационным детектором (стронций-90) в колонке длиной 1,2 м с неподвижной фазой 10% силиконового эластомера SE-30 (или QF-1) на целите-545 зернением 120 меш. Температура колонки 240°С, расход газа 60 мл/мин. Идентификацию проводят путем сравнения времени удерживания пиков образца с пиками «свидетелей», в качестве которых используют синтетический α -токоферол и соевое масло, содержащее, как известно, только α -, β - и γ -токоферолы. Длительность анализа 20 мин.

3.2.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИГЛИЦЕРИДОВ, АМИНОКИСЛОТ, УГЛЕВОДОВ

Образование специальных производных для нелетучих веществ в нормальных условиях дает возможность анализировать их методом ГЖХ, благодаря чему область ее применения значительно расширяется. В круг веществ, анализируемых ГЖХ, входят витамины, триглицериды, кислоты Кребса, аминокислоты, углеводы и некоторые другие соединения. Успех получения нужных производных для столь разнообразных веществ связан с появлением в конце 60-х годов таких реагентов, как триметилсилильные (ТМС) производные имидазола, бис-триметилсилилацетамид (БСА), бис-триметилсилилтрифторацетамид (БСТФА) и другие, которые позволяют получать неполярные производные соединения, имеющие довольно большое давление пара в условиях хроматографического разделения [168, 154].

Для разделения веществ с малой летучестью без использования производных перспективным является метод, в котором подвижной фазой является газ, находящийся при температуре и давлении, выше критических. При давлении порядка 2000 атм большинство газов напоминает жидкости и имеет свойства, аналогичные свойствам жидкостей, поэтому их можно использовать в качестве растворителей.

Определение триглицеридов

Метод ГЖХ позволяет анализировать глицериды после их перевода в легколетучие производные, например триметилсилильные (полученные в результате этерификации их в пиридине) или ацетаты.

В качестве НЖФ используют термостойкие жидкости типа SE-30 или IXR, которые разделяют глицериды только по числу углеродных атомов. Для отделения глицеридов насыщенных жирных кислот от ненасыщенных применяют метод ТСХ на силикагеле, обработанном азотнокислым серебром. Такое сочетание ГЖХ с ТСХ позволяет получить более полные данные [176].

Определение аминокислот

Преимущества ГХ способствовали применению ее для анализа аминокислот. Для определения состава аминокислот необходим гидролиз белка и перевод аминокислот в летучие соединения.

Чтобы их анализировать методом ГЖХ, надо уменьшить полярность (удаляя или защищая функциональные группы) для увеличения летучести и предотвращения необратимой адсорбции в колонке. С этой целью приходится прибегать к образованию производных соединений с помощью химических методов.

При работе с аминокислотами используют такие производные, как триметилсилильные (НО—ТМС-производные), фенилтиогидантоиновые (ФТГ), N-ацетиловые, n-алкил-N-трифторацетиловые эфиры и т. п. [168, 23, 170, 154].

Разделены 19 аминокислот, наиболее распространенных в протеинах пищевых продуктов в виде n-бутил-N-трифторацетильных производных [170].

Для этого аминокислоты этерифицируют n-бутанолом, но, так как они плохо в нем растворимы, их растворяют в абсолютном метаноле и проводят этерификацию в присутствии сухого хлористого водорода. Затем метанол с хлористым водородом удаляют дистилляцией, а метиловые эфиры аминокислот растворяют в n-бутаноле и проводят переэтерификацию в присутствии сухого хлористого водорода.

Полученные бутиловые эфиры аминокислот подвергают ацетилированию трихлоруксусной кислотой в присутствии хлористого метилена. Эту реакцию проводят в герметично закрытой трубке при 150°С в течение 5 мин. В этих условиях ацетируются все аминокислоты и даже их третичная функциональная группа [227].

Поскольку диапазон молекулярных весов разделяемых аминокислот большой, рекомендуют применять программированный нагрев колонки. Использование полиэфирных фаз не позволяет количественно определить аргинин, гистидин, цистеин. Для определения аминокислот рекомендуют применять две колонки: с полиэфирными фазами (ПЭГА) и с силиконом (OV-1, OV-17).

Определение углеводов

В области ГХ-разделения производных сахаров сравнительно мало работ [141, 157], но эта область, по мнению многих исследователей, является весьма привлекательной из-за большого числа возможных изомеров, а также благодаря высокой разделительной способности метода. Углеводы методом ГЖХ обычно анализируют в виде триметилсилильных производных (ТМС), отличающихся повышенной летучестью.

Однако в процессе силилирования может образоваться несколько изомеров для каждого сахара, что затрудняет количественную оценку хроматограмм. Установлена возможность перевода сахаров в полиолы путем восстановления боргидридом. Но боргидридное восстановление сахаров нестереоспецифично, поэтому также возможно образование продуктов, которые затрудняют воспроизведение хроматограмм.

В литературе [141] имеются указания о том, что более точным методом является ГЖХ сахаров в виде ацетатов альдонитрилов, которые при анализе смеси моносахаридов проявляются в виде одного пика для каждого сахара. Этим методом в виноградном сусле и вине количественно определены L-арабиноза, D-галактоза, D-манноза, D-глюкоза, D-ксилоза, L-рамноза. Условия разделения на хроматографе «Хром-4» следующие: колонка длиной 2 м и диаметром 3,5 мм наполнена хроматоном N-AW-HMPS с 5% силикона ХЕ-60; детектор ПИД; программированный нагрев колонки от 180 до 225°С; скорость газа-носителя (гелия) 50 мл/мин.

3.2.7. АНАЛИЗ АРОМАТА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Исследование многокомпонентных смесей органических соединений, которыми являются ароматические вещества, — сложная и комплексная задача.

В настоящее время практически отсутствует единая теория запаха. Трудоемкость задачи станет еще более понятной, если учесть, что в большинстве натуральных продуктов вещества, обладающие специфическим запахом, присутствуют в ничтожно малых концентрациях: 0,01 % — 0,0001 %.

При газохроматографическом изучении аромата пищевых продуктов перед исследователем встает целый ряд задач:

1. Большое количество веществ в ароматическом комплексе, которые относятся к самым разнообразным классам органических соединений: кислоты, спирты, сложные эфиры, серосодержащие соединения (амины), альдегиды, кетоны, эпоксиды, фенолы, углеводороды и т. д. Одни из них являются естественными продуктами биологических процессов, другие возникают в результате технологической обработки продукта. При этом не все компоненты играют существенную роль в формировании запаха.

2. Большое разнообразие веществ внутри одного класса соединений, присутствующих в пороговых концентрациях (10^{-6} г).

3. Широкий диапазон температур кипения веществ ароматического комплекса, начиная от газов и кончая соединениями с температурой кипения 280—300°С.

4. Невозможность получения исчерпывающей информации о количественном составе компонентов запаха при существующих методах анализа.

Естественным началом исследования природы запаха является идентификация летучих компонентов природных веществ. Для идентификации компонентов запаха применяют различные виды хроматографии, масс-спектрометрию, ИК- и ЯМР-спектроскопию.

Газожидкостная хроматография дает возможность разделить сложную смесь на индивидуальные соединения и одновременно получить сведения для их идентификации. Чувствитель-

ность газохроматографического метода с пламенно-ионизационным детектором 0,01 μ , в то время как для получения четкого спектра в ИК-спектроскопии требуется не менее 1 мг вещества, а при ЯМР-спектроскопии — 10 мг. Применение специального накопителя позволяет уменьшить навеску исследуемого компонента до 1 мг, однако получение даже такого количества индивидуального вещества представляет значительную трудность. Сравнение чувствительности газохроматографического метода с возможностями человеческого органа обоняния (носа) показало, что для некоторых соединений, например меркаптанов, искусственный детектор не выдерживает сравнения (табл. 5).

Таблица 5
Пределы чувствительности человеческого носа и хроматографа с пламенно-ионизационным детектором [248]

Вещество в водном растворе	Температура кипения, °C	Граница детектирования, р. р. т.	
		пид	нос
н-пропаналь	61	0,0025	0,17
н-бутаналь	75,7	0,12	0,07
н-гексаналь	131,0	0,3	0,03
Ацетон	56,0	0,3	500
Метилмеркаптан	7,6	0,013	0,002
Метилсалицилат	222,0	—	0,1
Ванилин	285,0	—	$0,1 \cdot 10^{-9}$

Примечание. Для ванилина граница детектирования определялась в воздухе.

Как видно из табл. 5, определенной связи между чувствительностью носа и детектора хроматографа не существует; в одних случаях более чувствителен нос (меркаптан, ванилин), в других — хроматограф. Это является одной из причин, которая осложняет получение количественных данных при анализе аромата пищевых продуктов.

Поскольку метод газовой хроматографии наиболее широко используется в химии аромата, рассмотрим особенности его применения.

В настоящее время определились два основных направления при изучении аромата продукта:

- получение ароматограмм с целью дегустационной оценки качества продукта;
- анализ аромата и проведение детальной идентификации детектируемых компонентов.

Для исследования аромата пищевых продуктов получил распространение анализ насыщенного пара над измельченным продуктом, находящимся в закрытом сосуде, — метод «head

space». Важными преимуществами этого метода являются простота подготовки пробы и «мягкие» условия ее обработки, исключающие какие-либо изменения в соотношениях компонентов запаха.

Сущность метода в том, что либо продукт в закрытом сосуде выдерживают 2—3 ч при температуре 25—30°С, либо моделируют процесс «заварки» при температуре 90—95°С, как это делают дегустаторы для таких продуктов, как чай [249]. Затем шприцем отбирают 5—10 мл паровой фазы и хроматографируют. Ароматограммы даже без детальной расшифровки могут применяться для характеристики качества исследуемых продуктов.

Использование этого метода эффективно при анализе низкокипящих компонентов ароматического комплекса. Такой метод применяют для изучения окислительных процессов при хранении жареных цыплят и появления постороннего привкуса, связанного с нарастанием н-гексана [240], а также для оценки качества и установления сроков хранения кофе, какао, овощей и фруктов, мясных консервов.

При анализе высококипящих компонентов необходимы специальные методы их выделения и концентрирования.

В настоящее время в основном практикуют три способа извлечения компонентов аромата из пищевых продуктов:

продувку инертным газом измельченной навески продукта (газовая экстракция);

экстракцию легколетучими органическими растворителями;

вакуумную дистилляцию летучих веществ с одновременным улавливанием компонентов в системе охлаждаемых ловушек.

Газовая экстракция

Этот метод чаще всего применяют при извлечении летучих веществ из воздушно-сухих продуктов. Для этого используют различные приборы и схемы анализа.

При исследовании аромата хлеба [238] 500 г хлебных изделий измельчают и подогревают до 60°С в колбе емкостью 5000 мл. Спустя час в течение 4 ч продувают азот со скоростью 3 л/ч. Летучие вещества, захваченные газом, проходят через вертикальный холодильник (конденсация паров воды) и хлоркальциевые трубки в стеклянные трубки-ловушки с внутренним диаметром 6 мм, охлаждаемые жидким кислородом. В этом аппарате возможны потери летучих веществ за счет адсорбции на хлористом кальции, а также практически исключаются из анализа компоненты с температурой кипения выше 100°С, так как они будут конденсироваться в вертикальном холодильнике вместе с парами воды.

Летучие компоненты жареного кофе [239] выделяют в токе сухого или влажного инертного газа. Для этого 50 г кофейной

пыли помещают в стеклянную трубку, подогревают на водяной бане до 95°C и в течение 2,5 ч пропускают сухой или влажный азот со скоростью 90 мл/мин. Газовый поток с ароматическими веществами сначала охлаждают ледяной водой, затем в ловушках, погруженных в смесь спирта и сухого льда. Применение увлажненного газа значительно повышает выход летучих веществ. Выделенный концентрат ароматических веществ обладает острым запахом свежеежаренного кофе, при комнатной температуре изменяется за несколько часов, при 20°C в атмосфере азота эти вещества сохраняются без изменений в течение недели.

Установлено, что при отгонке летучих веществ в токе инертного газа У-образные ловушки, охлаждаемые жидким азотом или воздухом, не обеспечивают полной концентрации веществ, так как часть из них теряется в виде тумана. В связи с этим предложены различные конструкции ловушек, в которых туман разрушается под действием электрического поля, либо проводится накапливание летучих веществ в короткой колонке, заполненной хроматографической насадкой и являющейся частью аналитической колонки хроматографа. Применение такой предколонки значительно увеличивает как число детектируемых компонентов, так и их концентраций в пробе.

Этот метод выделения компонентов аромата нашел применение при разработке приставки к хроматографу «Цвет-3» по АПЗ-методу (анализ пищевых запахов) — [12]. Температура отбора пробы при отгонке ароматических веществ обычно от 37 до 75°C , скорость потока гелия 10 мл/мин, разделение компонентов ароматического комплекса проводится на капиллярных колонках длиной 50 м. Одним из недостатков такого метода является длительность выделения летучих веществ, возможные потери в виде тумана низкокипящих соединений в низкотемпературных ловушках.

Экстракция органическими растворителями

Для выделения ароматических компонентов в особо «мягких» условиях часто используют органические растворители. К растворителю, применяемому для экстракции, предъявляют следующие обязательные требования: низкая температура кипения; максимально возможная чистота; отсутствие химического взаимодействия растворителя с экстрагируемыми веществами.

В настоящее время наибольшее распространение получили пентан (температура кипения — $36,3^{\circ}\text{C}$), серный эфир (температура кипения — 34°C) и хлористый этил (температура кипения — 12°C). Модификация этого метода с использованием в качестве экстрактанта жидкого газа (CO_2) под большим давлением [225] дает возможность избежать потерь наиболее летучих соединений. Однако, помимо общих недостатков экстракции

онного метода, для этой методики характерна сложность технического исполнения.

Экстракцию чаще всего применяют при анализе ароматических веществ жидких пищевых продуктов. Поскольку не существует универсального растворителя, в равной степени извлекающего различные ароматические вещества, используют набор растворителей, различающихся своей полярностью. Так, ароматические вещества вин извлекают [226] серным эфиром, пентаном, хлористым этилом, метиленхлоридом и смесью сжиженных углекислоты и пропана.

Свойство пентана не извлекать спирт и воду было использовано [174] при экстракции сивушных масел коньячного спирта. Для максимального извлечения компонентов аромата применяли смесь серного эфира и пентана в соотношении 2:1 или 1:1. Некоторые исследователи считают, что проведение экстракции в атмосфере инертного газа при комнатной температуре практически полностью исключает возможность окислительных процессов эфирных масел.

При экстракции веществ из водных растворов рекомендуется применять специальные аппараты для работы с растворителями, которые легче воды.

Методы экстракции широко используют для выделения компонентов аромата вин, соков и эссенций, мяса, молока, шоколада [121, 234, 245].

Основным недостатком метода экстракции является выделение вместе с ароматическими веществами различных нелетучих компонентов (смолы, воски, пигменты, липиды и др.). Кроме того, при экстракции полностью извлекают не все группы компонентов, особенно при работе с водными растворами. Установлено [226], что коэффициенты распределения спиртов между водой и эфиром при экстракции водных растворов спиртов имеют следующие величины: метанол — 0,14; этанол — 0,26; н-пропанол — 1,80; н-бутанол — 7,70; изоамиловый спирт — 19,00. При такой паре растворителей количественная экстракция метанола и этанола практически невозможна.

Метод дистилляции

Дистилляционные методы выделения компонентов аромата можно разделить на две основные группы:

перегонка летучих веществ с водяным паром при обычном атмосферном давлении или в атмосфере инертного газа; вакуумная дистилляция.

Перегонка с водяным паром — наиболее простой из существующих дистилляционных методов выделения летучих веществ. Таким методом удается выделить компоненты с температурой кипения до 300°С. Один из вариантов аппарата для проведения паровой дистилляции представлен на рис. 12.

Однако простота получения дистиллята осложняется рядом факторов, которые в значительной степени снижают ценность этого метода. При длительном воздействии высокой температуры возможно вторичное образование значительных количеств летучих компонентов из нелетучих предшественников. Это подтверждается исследованиями меда, хмеля, чая. При отгонке с паром летучих веществ хлеба образуется индол, обладающий неприятным запахом [238].

Отрицательное воздействие высокой температуры и окислительных процессов на компоненты ароматического комплекса удается несколько уменьшить, барботируя греющий пар через

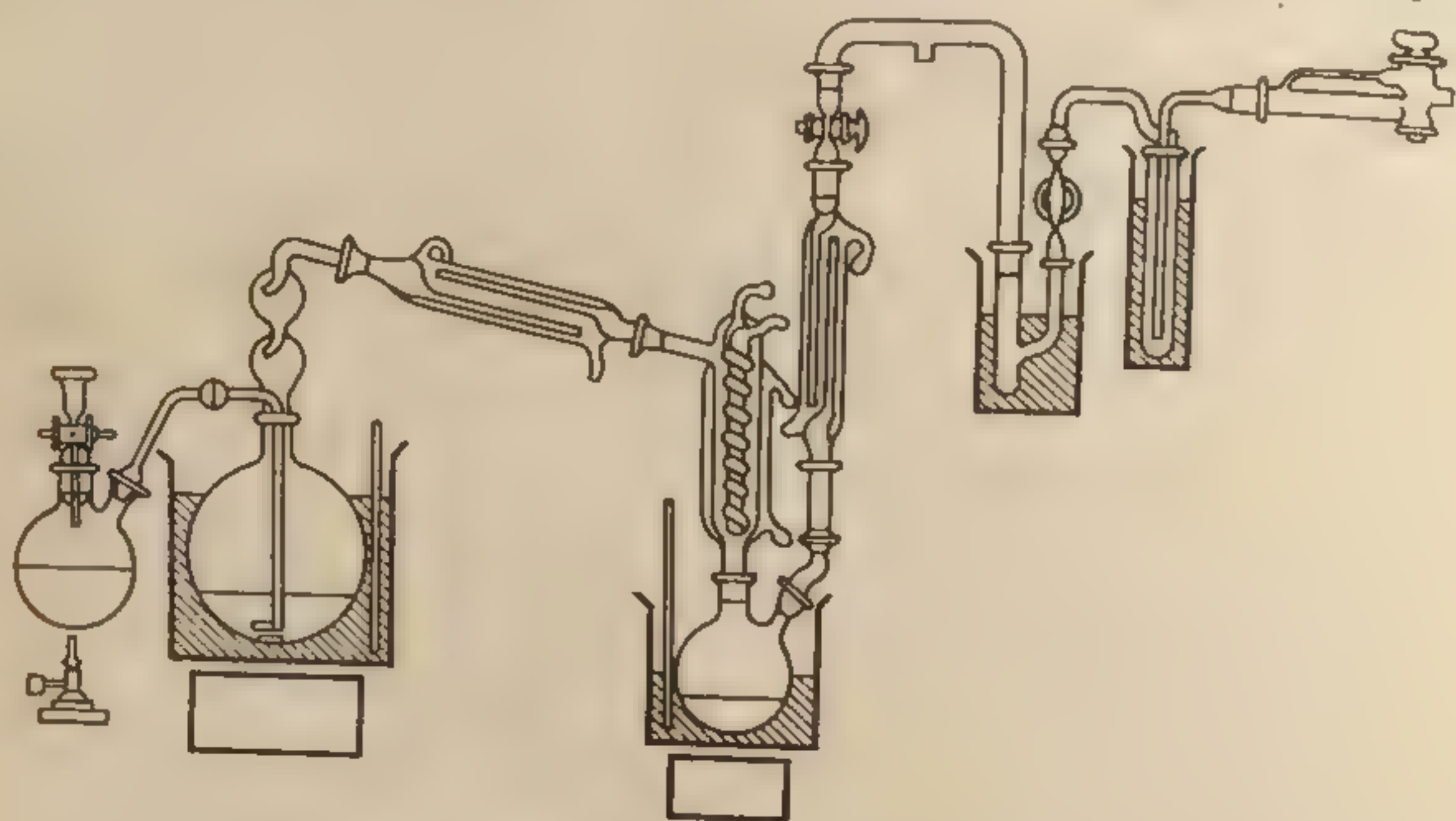


Рис. 12. Аппарат для перегонки (с водяным паром при пониженном давлении) и одновременного концентрирования дистиллята

слоя продукта, а также применяя отгонку с паром в токе инертного газа.

При анализе ароматических веществ очень важным является момент их выделения из анализируемого продукта без изменения состава. А поскольку к ароматическим веществам относятся соединения, перегоняющиеся при 10^{-3} мм рт. ст. при комнатной температуре, все большее признание у исследователей, работающих в области анализа аромата пищевых продуктов, получает метод вакуумной дистилляции.

Преимуществами этого метода являются «мягкие» условия обработки продукта, отсутствие реагентов и относительная быстрота анализа. Применение системы низкотемпературных ловушек и специальных ловушек позволяет практически полностью улавливать ароматические вещества.

Перед вакуумной дистилляцией продукт обычно подвергают гомогенизации, что увеличивает полноту извлечения ароматических веществ. Однако при отгонке происходит значительное разбавление летучих соединений большим количеством воды, что впоследствии затрудняет их извлечение и концентрирование.

Поэтому в некоторых случаях применяют вакуумную дистилляцию воздушно-сухого или натурального продукта [231].

С этой точки зрения представляет интерес работа по исследованию аромата бананов. 150 г очищенного от кожицы продукта растирали с песком для возможно более полного разрушения клеток. Измельченный образец помещали в литровую круглодонную колбу и погружали в баню с сухим льдом и этанолом до полного замораживания. Воздух из колбы вытеснялся азотом, колбу плотно закрывали и температуру образца поднимали до комнатной, после чего проводили повторное замораживание для окончательного разрушения клеток. Дистилляцию проводили при 1 мм рт. ст., летучие вещества конденсировали в ловушках, охлаждаемых смесью сухого льда и спирта (-78°C).

При вакуумной дистилляции удастся полностью сохранить ароматические вещества, выделенные из растительных продуктов при давлении 4 мм рт. ст. и температуре $20-30^{\circ}\text{C}$.

В настоящее время предложено большое количество разнообразных охлаждаемых ловушек, например охлаждаемая рас-солон при температуре -18°C .

Условием успешного проведения вакуумной дистилляции ароматических веществ является отсутствие в используемой аппаратуре металлических деталей, которые приводят к разрушению, например, таких веществ, как карбонильные соединения. В специально проведенном опыте [245] на выходе из холодильника помещалась металлическая сетка площадью 150 см^2 , изготовленная из различных материалов. При этом оказалось, что нержавеющая сталь разрушала карбонильные соединения на 0—25%, алюминий — на 3—34, медь — на 9—20, олово — на 14—34, железо — на 18—45%.

Применение низкотемпературных ловушек [195], охлаждаемых до -60°C , в значительной степени исключает потери низкокипящих компонентов. В то же время применение ловушек, охлажденных до -196°C , приводит к образованию тумана низкокипящих компонентов, разрушить который удастся, применяя ловушки с градиентом температуры либо используя целит в качестве наполнителя ловушек.

При использовании методов адсорбции на древесном угле потери веществ снижаются, однако получить адсорбент без следовых количеств примесей очень трудно. Выделение веществ путем их тепловой десорбции в паровой фазе не удастся провести количественно, а применение органических растворителей приводит к загрязнению образца.

Сравнительная оценка различных методов выделения летучих веществ [229] показала, что максимальное число пиков на хроматограмме характерно для образца, полученного адсорбцией на активированном угле, по сравнению с паровой дистилляцией и прямой экстракцией органическим растворителем. Од-

нако адсорбционный метод нельзя считать лучшим, поскольку образование многих веществ возможно в результате побочных реакций.

Завершающим этапом практически всех методов выделения ароматических веществ, которые обуславливают аромат и вкус

продукта, является концентрирование экстракта, полученного тем или иным способом. Чаще всего концентрирование проводят с помощью перегонки, вымораживания или адсорбции. Удаление растворителя или разбавителя проводят таким образом, чтобы не происходило чрезмерного перегрева веществ, подлежащих концентрированию.

На рис. 13 показан аппарат, применяющийся для выделения летучих веществ из высококипящего растворителя.

Разрабатываются методы вымораживания и зонной плавки, которые считаются наиболее эффективными способами концентрирования, так как позволяют избежать потерь, загрязнения и образования вторичных продуктов за счет побочных реакций. Однако использование этих методов осложняется техническими трудностями, возникающими при реализации подобных установок.

К методам анализа аромата пищевых продуктов, которые не удается классифицировать как дистилляционные, относятся достаточно широко

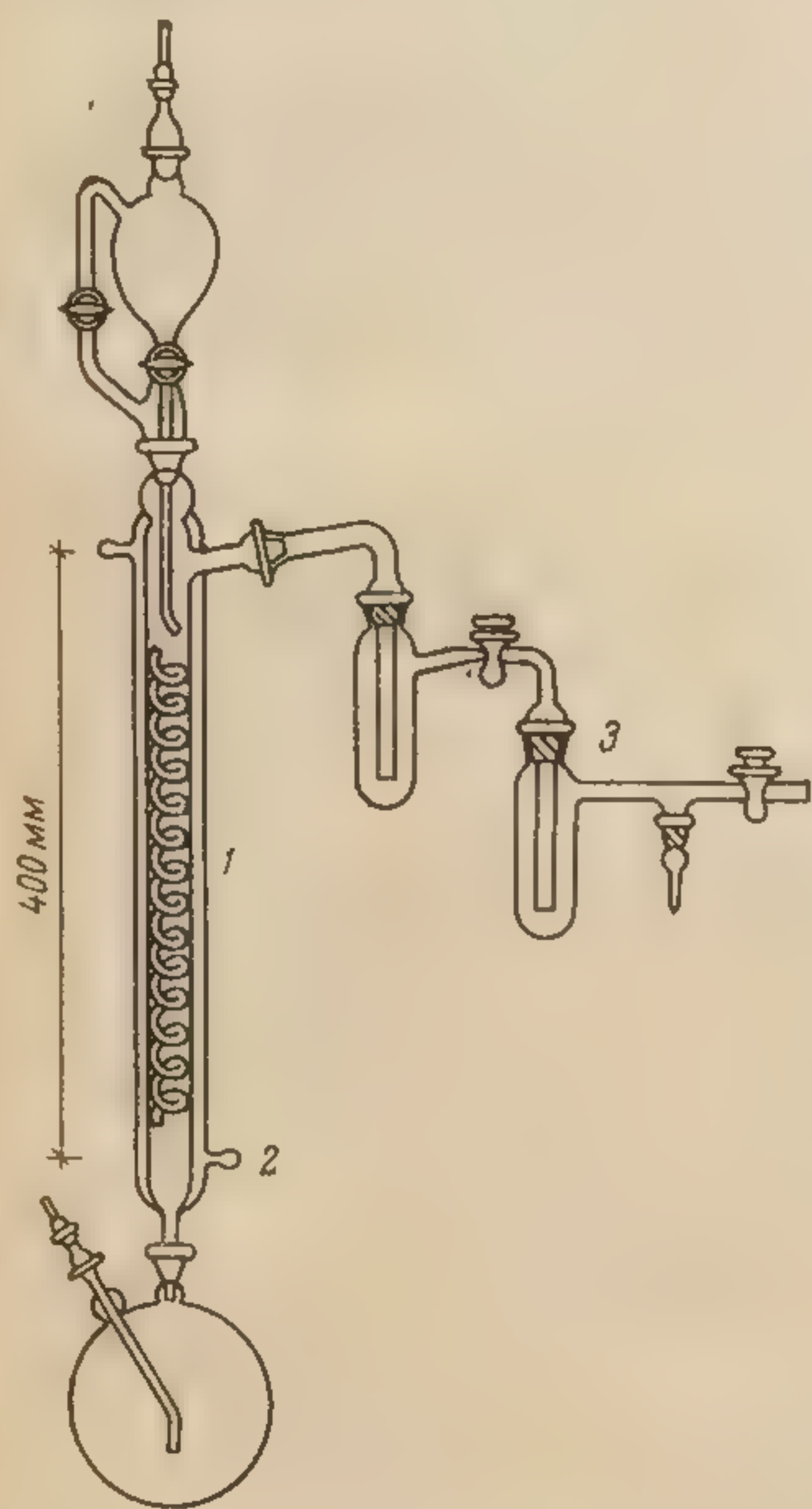


Рис. 13. Аппарат для выделения летучих веществ из высококипящих растворителей, жиров, масел:

1 — спираль из стеклянного стержня, плотно прилегающая к стенкам; 2 — вход для нагревающей жидкости; 3 — секция перегонки под вакуумом

известные методики прямого анализа пара над образцом пищевого продукта. Достоинства и недостатки этого метода анализа по сравнению с методом полного анализа летучих компонентов приведены ниже.

На природу компонентов и количество окончательно идентифицируемых веществ влияют относительное содержание в продуктах белков, жиров и углеводов, а также их влажность и физическое состояние.

При анализе состава метода... нении разл... ленных эта... ческих ве... или исклю... рата аром... ски [168].

Одним из использованных разрушающих летучих... ский аром... химическо... учесть, ли... гает прям... образом

На пр... состав па... ществ са... ствительн... фического... для веще... одной ча...

Налич... над водн... ружено д... дов. Ана... чая обна... тать кон... хого чая...

Одни... анализа... рах не... ление. В... возможн... графиро... важно... ствие р... стацион... нельзя... тодов а...

Хрома...

Не ме... обусл... физичес...

При анализе аромата продукта сложного химического состава методом полного анализа летучих компонентов и применении различных методов дистилляции и экстракции на определенных этапах анализа возможны изменения состава ароматических веществ, которые практически не удается предугадать или исключить. Появление атерфактов при выделении концентрата ароматических веществ можно установить органолептически [168]. Однако надежность такого метода весьма низкая.

Одним из способов преодоления этих трудностей является использование «мягких» условий обработки пробы, исключающих разрушение образца и изменение природного соотношения летучих компонентов, которое часто и определяет специфический аромат того или иного продукта. Помимо этого, влияние химического состава и физического состояния продукта удается учесть, лишь используя метод «head space», который предполагает прямой анализ летучих компонентов, находящихся в паровом состоянии над поверхностью продукта.

На примере исследования ряда продуктов установлено, что состав пара полностью обуславливается составом летучих веществ самого продукта. При наличии детектора высокой чувствительности и хорошо воспроизводимых условий хроматографического анализа удается получать точные результаты [233] для веществ, содержащихся в продукте в концентрации менее одной части на миллион.

Наличие линейной зависимости высоты пиков паров веществ над водными растворами от их концентрации в растворах обнаружено для спиртов, альдегидов, кетонов, эфиров и дисульфидов. Аналогичную зависимость для легколетучих компонентов чая обнаружил Викаремасинге [249], которому удалось рассчитать концентрацию отдельных компонентов в мг на 100 г сухого чая.

Одним из недостатков этого метода являются затруднения анализа высококипящих компонентов, которые при температурах не более 100°С имеют довольно низкое парциальное давление. В то же время несомненными преимуществами являются возможность автоматизации процесса отбора пробы и хроматографирования, высокая воспроизводимость и, что особенно важно для качественной оценки пищевых продуктов, — соответствие результатов хроматографического анализа данным дегустационной оценки качества вкуса и аромата продукта, чего нельзя в настоящее время сказать о большинстве прочих методов анализа аромата пищевых продуктов.

Хроматографическое разделение

Не менее важным и ответственным этапом анализа веществ, обуславливающих аромат продукта, является их хроматографическое разделение. При решении задачи идентификации

отдельных компонентов ароматического комплекса либо при изучении количественных изменений его отдельных компонентов при хранении продукта неизменно основное условие — правильный выбор типа хроматографической колонки и параметров процесса разделения. Поскольку концентрации компонентов в смеси могут отличаться друг от друга более чем в 1000 раз, необходимо также использовать детекторы с широким линейным диапазоном (порядка 10^6). Причем детектор должен чувствовать присутствие веществ в следовых количествах, а колонки в то же время обладать способностью разделять пробы большого объема (часто встречающийся в практике хроматографирования пример анализа микропримесей и следов летучих соединений).

Компоненты смеси бывают соединениями самой различной полярности, с самыми различными функциональными группами. Поэтому за редким исключением удастся добиться приемлемого разделения, используя одну колонку. Во избежание наложения пиков чаще всего приходится проводить анализ на двух-трех колонках с жидкими фазами различной полярности.

Так как попытки связать селективность жидкой фазы и ее разделяющую способность во многих случаях оказались безуспешными, исследователи добиваются оптимального разделения подбором колонок на основе собственного опыта.

Выбирая тип колонки, необходимо помнить, что капиллярные колонки имеют максимальную эффективность разделения.

Обладая высокой эффективностью разделения, капиллярные колонки малого диаметра (0,2 мм) способны разделять лишь пробы малого объема (0,005 мг). А поскольку разделение обычно предшествует идентификации компонентов, которая требует значительных количеств индивидуальных компонентов, для увеличения емкости колонки при сохранении ее высокой эффективности разделения используют капиллярные колонки большого диаметра (0,7—1,0 мм) и большой длины (до нескольких сотен метров). Это позволяет увеличить количество пробы, вводимой в хроматограф, до 1 мг.

Недостатком капиллярных колонок увеличенного диаметра является очень большое время выхода из них разделенных веществ. Например, для элюирования из колонки длиной 350 м несорбирующегося газа требуется 30—45 мин [168] в зависимости от скорости газа-носителя. Следовательно, для регистрации полной хроматограммы может потребоваться несколько часов.

Высокой разделительной способностью и значительной емкостью обладают капиллярные колонки с жидкой фазой на носителе, микронасадочные колонки [224] и многоканальные капиллярные колонки [235].

Колонки первого типа особенно эффективны, так как обладают диаметром 0,5 мм и длиной 16,5 м; они компактны, что

облегчает регулирование температуры и скорости газа-носителя.

Аналогичную эффективность имеют насадочные колонки, представляющие собой длинные (до 20 м) трубки диаметром 2,5 мм, заполненные однородным носителем с малым содержанием жидкой фазы.

Анализ с использованием насадочных колонок требует меньше времени, однако для этого необходимо очень высокое давление на входе (до 14 атм), что, в свою очередь, осложняет процесс введения пробы в колонку. Высокая скорость в них газа-носителя не дает возможности использовать эти колонки в системах хроматограф-масс-спектрометр. С помощью высокоэффективных насадочных колонок при хроматографировании получают четкие пики, легко детектируются малые пики, соответствующие следовым примесям, и легко улавливаются компоненты для их дальнейшей идентификации.

Однако, располагая хроматографической колонкой с высокой эффективностью разделения, нельзя даже надеяться, что удастся разделить полностью сложнейшую смесь органических соединений, которыми являются ароматические комплексы большинства пищевых продуктов. Решая эту задачу, чаще всего используют либо предварительное разделение на фракции с помощью хроматографирования на насадочных колонках повышенного диаметра (препаративный вариант), либо методы химического фракционирования.

При анализе веществ аромата пищевых продуктов, исходя из реальных количеств проб, обычно используют для предварительного разделения колонки диаметром 3,5 мм. Эти колонки просты в изготовлении, обеспечивают высокую эффективность разделения при соответствующей длине и главное — обладают достаточной емкостью для разделения проб порядка 1 мг.

Так как разделительная способность колонки зависит в основном от природы неподвижной жидкой фазы, важным моментом является правильный выбор подходящей жидкой фазы.

Результаты исследования ароматических веществ некоторых пищевых продуктов показали, что полярные жидкие фазы типа β, β' -оксидипропионитрил и различные карбоваксы оказываются более эффективными по сравнению с неполярными апъезонами и силиконовыми маслами. Однако всегда для получения максимально возможного разделения используют колонки с фазами различной полярности.

Применение при анализе ароматических веществ программирования температуры колонки вызывает необходимость обращать внимание на вязкость жидкой фазы во всем интервале температур. Коэффициент диффузии в жидкой фазе зависит от ее вязкости, что, в свою очередь, определяет эффективность колонки, поэтому для получения лучшего разделения рекомендуется применять жидкие фазы с низкой вязкостью.

Не менее важным свойством жидкой неподвижной фазы является также ее температура кипения и термическая стабильность. Она должна иметь минимальное давление паров при температуре опыта и температуру термической деструкции много выше температуры анализа; в противном случае при сборе разделенных веществ с целью их дальнейшей идентификации отдельные фракции будут загрязнены парами фазы или продуктами ее деструкции.

Как уже отмечалось выше, широкий интервал температур кипения летучих компонентов аромата продуктов вызывает необходимость проводить анализ при программировании темпера-

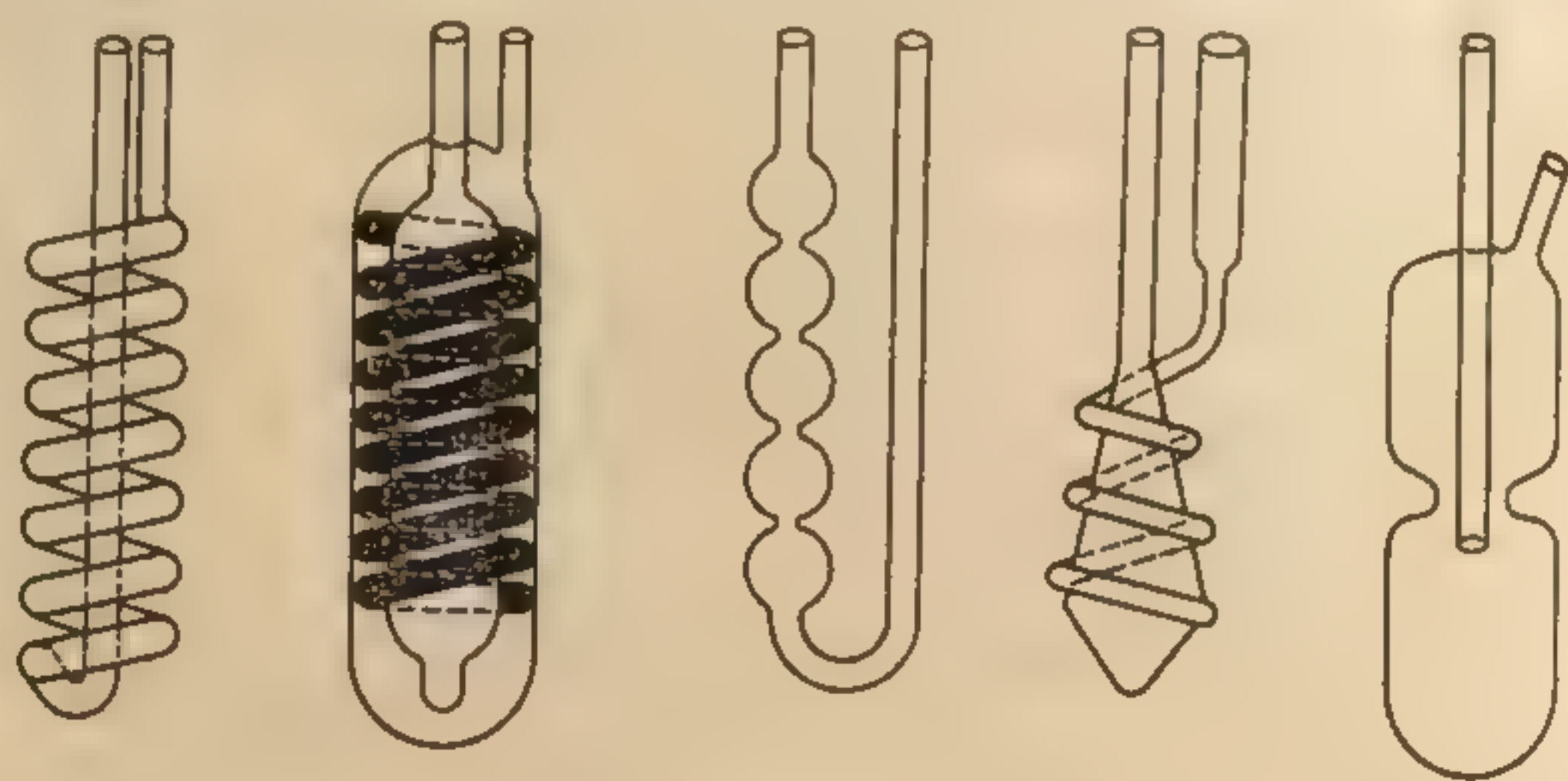


Рис. 14. Сборники для улавливания разделенных компонентов

туры. Имеются исчерпывающие работы [204] по теории и практике газовой хроматографии с программированием температуры, поэтому лишь напомним, что наилучшие результаты дает программирование температуры со скоростью 1—3 град/мин, но не выше 5 град/мин.

Варьируя температуру колонки в достаточно широком интервале, можно проводить концентрирование компонентов пробы (особенно при анализе паров над продуктом) повторным введением пробы пара и ожидая выхода из колонки воздуха, разбавляющего смесь.

После того как в начале колонки накопится достаточное количество веществ, начинают программирование температуры, при этом смесь компонентов хорошо разделяется.

Собирая отдельные фракции после предварительного хроматографирования на насадочных колонках в охлаждаемых ловушках, некоторые виды которых представлены на рис. 14, в дальнейшем каждую отдельную фракцию подвергают повторному хроматографированию на более эффективных колонках. Подобная схема анализа применялась при анализе эфирного масла зеленого чая. Примечательно, что препаративное разделение проводилось на насадочной колонке, заполненной 23%

карбовакса-6000 на шималите W. (60—80 меш), с внутренним диаметром 3 мм и длиной 3 м. Температура колонки программировалась от 70 до 190°С со скоростью 1 град/мин. Детектором служил катарометр.

При проведении повторного хроматографирования выделенных фракций использовались капиллярные колонки длиной 150 м и внутренним диаметром 0,02 мм, стенки которых были покрыты силиконовым маслом SF-96. Температура колонки программировалась в режиме аналогично препаративному фракционированию. В качестве детектора использовался масс-спектрометр. Идентификация компонентов проводилась с использованием параметров хроматограмм, данных ИК- и МС-спектропии с использованием спектров хроматографически чистых компонентов. Для описанного выше анализа, как и для большинства исследований сложных смесей ароматических веществ, характерно проведение химического фракционирования на основную, кислую и нейтральную фракции компонентов, что впоследствии значительно облегчило газохроматографическое разделение этих компонентов.

Рассмотренный выше пример довольно успешного использования комбинированной системы хроматограф-масс-спектрометр иллюстрирует возможности такой системы при анализе аромата пищевых продуктов. В данном случае удалось впервые обнаружить 12 компонентов и подтвердить присутствие 72 веществ, ранее идентифицированных в аромате зеленого чая. Однако не всегда удается добиться таких результатов, несмотря на, казалось бы, универсальность подобного подхода к решению задачи исследования летучих веществ пищевых продуктов. Это связано прежде всего с определенными недостатками комбинации капиллярного хроматографа с масс-спектрометром.

Основными недостатками являются следующие:

трудность воспроизведения капиллярной колонки, что влечет за собой нестабильность газохроматографических параметров;

уменьшение абсолютной концентрации веществ образца за счет разбавления; при этом исключаются из анализа компоненты, присутствующие в незначительных количествах;

предъявление очень высоких требований к разделительной способности колонки.

Однако в настоящее время не существует универсальной жидкой фазы, способной обеспечивать полное разделение практически любой смеси органических веществ. Это в значительной степени снижает возможности масс-спектрометра, поскольку он дает ценную информацию о строении веществ только при полном разделении компонентов и идентичности масс-спектра стандартному.

В связи с этим в Институте элементоорганических соединений АН СССР была предпринята успешная попытка разработки

бесстандартных методов идентификации для различных классов органических соединений, предварительно разделенных методами химического фракционирования [42].

Извлечение отдельных классов органических веществ с помощью их устойчивых химических производных имеет определенные преимущества: повышается относительная концентрация компонентов в пробе; уменьшается возможность наложения пиков на хроматограмме, так как анализу подвергаются соединения с идентичными функциональными группами; исключается взаимодействие с другими реакционноспособными соединениями.

Химическое фракционирование запахов

При обработке концентрата запаха кислотами отделяются органические основания, при промывании раствором Na_2CO_3 удаляются органические кислоты, слабым раствором щелочи извлекают фенолы. Легколетучие сернистые соединения отделяют пропусканием через системы ловушек, заполненных различными поглотителями. Сероводород извлекается раствором ацетата свинца, меркаптаны поглощаются раствором цианистой ртути, моно- и дисульфиды осаждаются раствором сулемы. Карбонильные соединения выделяются в виде гидразонов с реактивом Жирара Т (триметилацетгидразидаммонийхлорид) или солянокислым раствором 2,4-динитрофенилгидразина.

Нейтральная фракция содержит спирты и сложные эфиры. Сначала проводят ее газохроматографический анализ, затем эфиры гидролизуют или расщепляют действием LiAlH_4 . Кислоты отделяют, переводят в метиловые эфиры и хроматографируют. Оставшиеся спирты после отделения кислот хроматографируют. Сравнение хроматограмм до и после расщепления сложных эфиров позволяет обнаружить спирты, которые находились в составе эфиров. Определенные трудности возникают при проведении количественной регенерации летучих соединений из их производных, однако, подбирая соответствующие условия, можно добиться практически полной регенерации.

При проведении идентификации компонентов аромата прежде всего необходимо располагать хорошо воспроизводимыми газохроматографическими параметрами. Часто для оценки поведения вещества при хроматографировании используют относительное время удерживания, причем в этом случае поведение исследуемого вещества сравнивается с поведением вещества-стандарта в аналогичных условиях.

Поскольку ароматические вещества — это смесь компонентов, кипящих в очень широком интервале температур, необходимо использовать большое количество стандартов, что очень усложняет задачу идентификации этих компонентов. Более удобным оказалось применение для этих целей индексов удерж-

Таблица 6

Зависимость величины индекса удерживания от структуры анализируемого вещества

Уравнения зависимости индекса от n и природы функциональной группы	Функциональная группа	δI	Уравнения зависимости индекса от n и природы функциональной группы	Функциональная группа	δI
Для первичных аминов $I_{100}^{\text{пэг}} = 100_n + 586$	$-\text{NH}_2$	586	Для ω -алкеналей $I_{125}^{A_n^M} = 100_n - 17 + 188$	$\text{H}_2\text{C} = \text{C} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix}$	171
Для диаминов $I_{100}^{\text{пэг}} = 100_n + 2 + 586$				$-\text{C} \begin{smallmatrix} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{H} \end{smallmatrix}$	
Для вторичных аминов $I_{100}^{\text{пэг}} = 100_n + 330$	$\begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{NH}$	330	Для α -алкеналей $I_{125}^{A_n^M} = 100_n + 251$	$\begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{C} = \text{C} - \text{C} \begin{smallmatrix} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{H} \end{smallmatrix}$	251
Для третичных аминов $I_{100}^{\text{пэг}} = 85_n + 200$	$\begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{N} -$	200	Для метилкетона $I_{125}^{A_n^M} = 100_n + 171$	$\begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{C} = \text{O}$	171
Для алкенов-1 $I_{125}^{A_n^M} = 100_n - 17$	$\begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} \text{C} = \text{C} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix}$	-17	Для меркаптанов $I_{50}^{\text{сэ}} = 103_n + 291$	$-\text{SH}$	291
Для n -алкеналей $I_{125}^{A_n^M} = 100_n + 188$	$-\text{C} \begin{smallmatrix} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{H} \end{smallmatrix}$	188	Для сульфидов $I_{50}^{\text{сэ}} = 97_n + 297$.	$-\text{S}-$	297

живания Ковача, которые имеют хорошую воспроизводимость. Индексы удерживания выражают поведение веществ в единой шкале, за которую принимается гомологический ряд нормальных углеводородов.

В основе нестандартного метода идентификации лежат обнаруженные зависимости величин индексов удерживания от структуры исследуемого соединения: числа атомов углерода, количества функциональных групп, температуры кипения. Наличие такой закономерности дает возможность прогнозировать их газохроматографические параметры и в конечном итоге идентифицировать при отсутствии стандарта.

Схема анализа состоит в следующем. После получения концентрата летучих веществ продукта проводят выделение определенного класса соединений. Для газохроматографического анализа этого класса соединений подбирается система из трех-четырех колонок с различной полярностью с целью исключения ошибок из-за наложения пиков на хроматограмме. Окончательная идентификация проводится после расчета величин индексов и их зависимости от числа атомов углерода и температуры кипения.

До последнего времени значительную сложность представляло изучение аминов пищевых продуктов ввиду способности аминов сорбироваться на поверхности твердых носителей. Поэтому для исключения такого явления носитель обрабатывается щелочью, с которой первичные и вторичные амины образуют водородные связи [43]. Оказалось, что при применении системы из четырех колонок с тристеарином, вазелиновым маслом с 2% КОН, твином-80 и ПЭГ-1000 можно найти зависимость величины индекса от числа углеродных атомов для различных аминов (табл. 6).

Аналогичные уравнения найдены для смесей n -альдегидов, метилкетонов и α -ненасыщенных альдегидов. Для идентификации смесей этих классов карбонильных соединений необходимо провести анализ на колонках с апьезоном-М, полиэтиленгликольадипатом при 125°C и β,β' -оксидипропионитрилом при 50°C . Идентификацию проводили, используя данные табл. 6.

При изучении связи индексов удерживания со структурой компонентов обнаружена аддитивность вкладов различных функциональных групп. В табл. 6 показано влияние величины вкладов на величину индексов удерживания веществ различных функциональных групп на ПЭГ-1000, апьезон-М и SE-50.

Описанные выше методы идентификации относятся к изотермическим условиям анализа, однако оказалось возможным применение изотермических данных для идентификации компонентов в условиях программирования температуры, используя следующую формулу:

$$I^{T_0, \beta} = I^{T_0} + \frac{\beta \tau_x}{2} + \frac{\delta I}{\delta T}, \quad (32)$$

где $I^{T_0\beta}$ — индекс исследуемого вещества при линейном программировании температуры со скоростью β , град/мин от начальной температуры колонки T_0 ;

I^{T_0} — изотермический индекс при температуре T_0 ;

τ_x — время выхода вещества в режиме линейного программирования;

$\frac{\delta I}{\delta T}$ — температурный инкремент индекса на 1°C .

Применение разработанных методов идентификации позволило обнаружить в составе летучих компонентов сыра 29 монокарбонильных соединений.

Помимо рассмотренных методов идентификации компонентов аромата, в настоящее время существует большое количество специальных доколоночных реакций, с помощью которых значительно упрощается проведение расшифровки компонентов аромата. Методы газовой хроматографии, которые используются при обработке компонентов пробы в непрерывном потоке перемещающегося газа-носителя, относятся к области реакционной газовой хроматографии.

Доколоночные реакции можно классифицировать как общие реакции, применение которых возможно для широкого ряда соединений, и специфические, позволяющие определять только одну функциональную группу.

В настоящее время методы реакционной хроматографии не нашли достаточно широкого распространения при анализе аромата пищевых продуктов. Однако в некоторых случаях (прямой анализ пара над продуктом) иные методы идентификации практически оказываются непригодными, и это вызывает необходимость использования методов реакционной газовой хроматографии.

Из уже разработанных доколоночных реакций достаточно широко известны реакции гидрирования и дегидрирования, особенно успешно применяющиеся для выяснения строения углеводородного вещества и обнаружения места расположения двойных связей методом озонолиза, а также методы вычитания, которые позволяют проводить селективное удерживание одного или нескольких компонентов с определенными функциональными группами. На хроматограмме вычитание проявляется в полном или частичном исчезновении некоторых пиков.

Практическая реализация метода вычитания осуществляется введением в систему газового хроматографа реактора с сорбентом, на поверхность которого нанесено вещество, селективно реагирующее с определенным классом органических соединений. Обычно это трубка из нержавеющей стали, длиной 15 см и внутренним диаметром 6 мм. Вычитание компонентов удобно проводить при использовании двух параллельно включенных колонок, на выходе из одной расположен реактор (рис. 15).

Одной из причин, тормозящих широкое применение вычитающих реакторов, является недостаточная изученность влияния таких реакторов на компоненты, которые этим реактором не вычитаются, а также роль соседних функциональных групп в молекуле [140].

В составе аромата пищевых продуктов довольно редко встречаются нормальные углеводороды, поэтому методы вычитания этого класса компонентов в данной книге не будут подробно рассматриваться. Однако необходимо отметить, что эти соединения и олефины хорошо удаляются из сложных смесей молекулярным ситом 5А.

Первичные и вторичные спирты селективно удерживаются борной кислотой, нанесенной на поверхность твердого носителя.

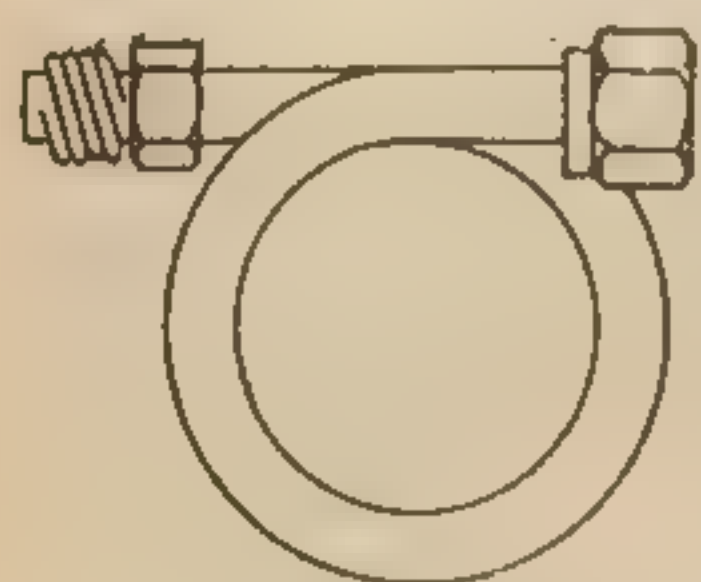


Рис. 15. Петлеобразный реактор для метода вычитания

Чаще прочих используется смесь одной весовой части борной кислоты и 20 весовых частей 5% карбовакса-20М на анакроме-АВЗ, либо на подобном носителе. Установлено, что степень вычитания не зависит от температуры в диапазоне 75—200°С и размера пробы в пределах 0,6—300·10⁻⁶ г.

Неразветвленные карбоновые кислоты рекомендуется удерживать в микрореакторе с наполнителем из смеси одной весовой части порошка окиси цинка и 10 весовых частей фосфорной кислоты. В этом реакторе все карбоновые кислоты вычитаются полностью, за исключением кислот, имеющих заместители

в α-положении. Этот реактор способен «вычитать» также спирты на 50% и фенолы на 20%. Метод применялся при выделении жирных кислот из экстрактов сгущенного молока.

Альдегиды, кетоны и эпоксиды, играющие значительную роль в формировании аромата многих пищевых продуктов, можно количественно вычитать, используя различные реакторы. Для выделения альдегидов и кетонов из смеси со спиртами и эпоксидами [160] используется неподвижная фаза из диатомитового кирпича с карбоваксом-1000, пропитанным солянокислым гидроксидом и водным раствором едкого натра (6%). Альдегиды и кетоны, превращаясь в оксиды, удерживаются неподвижной фазой, тогда как спирты и эпоксиды не взаимодействуют с ней.

В качестве селективного реагента на альдегиды и кетоны были использованы о-дианизидин и бензидин. Причем о-дианизидин, нанесенный на носитель, позволял количественно удерживать из смеси большое число самых разнообразных альдегидов. Для предотвращения выделения паров о-дианизидина конечный участок колонки длиной 1,3 см был заполнен носителем без амина. Этот реактор не вычитал кетонов, за исключением циклогексанона.

Петлеобразный реактор (диаметром 15 см) с наполнителем из 20% бензидина на хромосорбе Р при температуре 100-175°C эффективно удерживает альдегиды, большинство кетонов и эпоксиды. Эпоксиды можно успешно «вычитать» 5% фосфорной кислоты на хромосорбе, однако применение этого реагента не исключает возможности вычитания бензиловых эфиров и некоторых альдегидов.

* * *

Метод ГЖХ нашел широкое распространение в исследовании пищевых продуктов. Применение его наиболее эффективно в сочетании с другими физико-химическими методами анализа. Так, при разделении сложных комплексов природных соединений с широким диапазоном температур кипения хорошо зарекомендовала себя комбинация газожидкостной хроматографии с тонкослойной.

3.3. РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ

3.3.1. ОСНОВЫ МЕТОДА

Бумажная хроматография является одним из видов ЖЖХ. Распределение веществ, входящих в состав смеси, происходит между двумя жидкими фазами: подвижной и неподвижной. Подвижной фазой обычно служат органические растворители. Неподвижная фаза должна быть хорошим дифференциальным растворителем для хроматографируемых веществ и не должна растворяться или частично растворяться в подвижной фазе. Как правило, в качестве неподвижной фазы в бумажной хроматографии используют воду, удерживаемую волокнами специальной фильтровальной бумаги, которая предназначена для хроматографии.

Разделение смесей большинства веществ (углеводов, аминокислот, фенолов и др.) проводят в системе растворителей, состоящей из полярной неподвижной фазы и неполярной подвижной фазы. При анализе сложных смесей водонерастворимых веществ (липоидов, жирных кислот, жирорастворимых витаминов и др.) применяют метод «обращенных фаз», при котором подвижной фазой является полярная жидкость, а неподвижной — неполярная. В этом случае бумагу импрегнируют (пропитывают) гидрофобными веществами, например растворами парафина или растительного масла. Импрегнированная бумага служит носителем липофильной фазы.

При выполнении хроматографического исследования анализируемую смесь веществ (или их производных) в точно дозированном количестве с помощью калиброванной микропипетки

наносят в виде пятна или полоски по возможности минимальной площади на стартовую линию хроматографической бумаги. Чтобы исключить влияние диффузии в боковых направлениях, не рекомендуется наносить вблизи пятна, очень различающиеся концентрацией веществ. Во избежание необратимой сорбции бумагой части растворенных веществ смеси начальные пятна можно подсушивать только в токе холодного воздуха [211].

Бумага должна быть химически чистой. С этой целью ее иногда приходится дополнительно обрабатывать различными реагентами, образующими комплексные соединения с неорганическими примесями бумаги, и затем тщательно промывать водой.

Промышленность выпускает хроматографическую бумагу разной плотности, различающуюся по скорости движения растворителя в ней. Используемая в качестве носителя бумага должна быть приведена в соответствие с атмосферой хроматобокса. Для этого перед пропусканием системы растворителей бумагу с нанесенными пятнами смесей анализируемых веществ в течение 10—14 ч выдерживают в камере, насыщенной парами растворителей. Надежная герметичность камеры и поддержание постоянной температуры в процессе хроматографирования также являются необходимыми условиями для получения хороших результатов.

Метод бумажной хроматографии основан на распределении компонентов смеси между подвижной фазой и неподвижной, находящейся на носителе (целлюлозе). По окончании насыщения край бумажной полосы, возле которого нанесена смесь веществ, погружают в подвижный растворитель, насыщенный неподвижной фазой. Подвижный растворитель движется по бумаге под влиянием капиллярных сил (восходящая и радиальная хроматография) или гравитационных сил (нисходящая хроматография).

Разделение компонентов смеси происходит вследствие их различных коэффициентов распределения, которые определяются отношением концентрации растворенного вещества в неподвижной фазе к его концентрации в подвижной фазе при равновесии. В результате хроматографирования смесь анализируемых веществ распределяется по бумаге в виде отдельных пятен или полос. Для лучшего разделения веществ после высушивания бумаги хроматографирование можно повторить тем же способом один или несколько раз.

Оригинален метод двухмерной хроматографии, при котором повторное распределение веществ проводят в другом направлении и обычно с помощью другого подвижного растворителя. Если хроматограмма содержит неокрашенные пятна, то ее проявляют каким-либо реактивом.

При расшифровке хроматограммы учитывают положение пятен и их оптическую характеристику, сравнивая опытную хро-

матогамму с полученной в тех же условиях хроматограммой «свидетелей» (химически чистых веществ).

Положение каждого пятна характеризуют коэффициентом подвижности R_f или R'_f . R_f определяется как отношение расстояния, на которое продвигается зона данного вещества, к расстоянию, на которое продвигается фронт растворителя. Более стабильна величина R'_f , основанная на относительном расположении компонентов смеси и определяемая отношением расстояния продвижения зоны данного вещества к зоне продвижения стандартного компонента, в качестве которого выбирают вещество, всегда присутствующее в смеси и дающее на хроматограмме наиболее четкое пятно. Количественное определение веществ в зонах хроматограммы проводят одним из трех способов: фотометрическим определением оптической плотности элюатов; измерением площади пятен; прямым денситометрическим определением вещества на хроматограмме.

При полуколичественной оценке визуально сравнивают по интенсивности пятна веществ на опытной и стандартной хроматограммах. Точность этого метода колеблется от ± 15 до $\pm 50\%$ [158].

Метод измерения площади пятна основан на том, что при определенных условиях, в частности при нанесении на стартовую линию в виде маленьких пятнышек одинаковых объемов растворов веществ, площади получающихся на хроматограмме пятен пропорциональны логарифмам концентраций веществ в каждом пятне. Точность метода $\pm 5-10\%$ при резкой очерченности пятен. Если пятна диффузные, то целесообразно получить фотокопию на контрастной бумаге.

Более точен метод денситометрии, при котором хроматограмму сканируют лучом монохроматического света и долю отраженной или прошедшей через пятно лучистой энергии определяют фотометрией. Максимальная оптическая плотность пятна пропорциональна логарифму концентрации вещества в зоне. Если пятна не перекрываются и имеют круглую или эллипсоидную форму, то методом измерения интенсивности окраски пятна можно определять концентрацию вещества с точностью $\pm 1-2\%$ [211].

Наиболее распространен в количественной хроматографии метод элюирования, при котором достигается точность в пределах $\pm 1\%$. При этом способе пятна вырезают, вещества элюируют и определяют концентрацию их чаще всего по оптической плотности растворов, измеряемой фотоэлектроколориметрическим способом. Контрольным раствором должен служить не чистый растворитель, а элюат со свободного участка бумаги, ближайшего к исследуемой зоне. Так как окрашенные производные многих веществ обычно неустойчивы, фотометрирование следует проводить быстро. Нельзя допускать попада-

ния волокон бумаги в элюат. По оптической плотности растворов с помощью калибровочных графиков определяют концентрацию исследуемых веществ в элюатах, а затем, учитывая все разбавления по ходу работы, рассчитывают содержание веществ в продукте.

Метод распределительной хроматографии на бумаге широко применяется при исследовании фенолов, аминокислот, углеводов пищевых продуктов [116, 206], используется для разделения органических кислот, образующихся при превращениях углеводов [138], для исследования растительных пигментов [221, 222, 223], высших спиртов [72], альдегидов [199], сложных эфиров [191], для определения хлорорганических остатков (ДДТ и др.) в продуктах животного [137] и растительного [105, 139] происхождения.

3.3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОЛЬНОГО СОСТАВА КОПЧЕНЫХ ПРОДУКТОВ

Фенольные вещества играют определяющую роль в образовании вкусовых и ароматических свойств копченых продуктов. При копчении происходит хемосорбция фенолов тканями рыбы или мяса, и фенольные компоненты дыма или копильной жидкости переходят в слабосвязанное или прочносвязанное состояние с веществами, входящими в состав пищевого продукта. Специфические «копченые» вкус и аромат обусловлены присутствием в продуктах слабосвязанных фенолов, называемых также летучими. Определение прочносвязанных фенольных компонентов более длительно, трудоемко, и на хроматограммах проявляются лишь четыре-пять веществ фенольной природы.

При исследовании фенольного состава копченых продуктов фенолы из навески отгоняют с паром, затем очищают от примесей кислотного и нейтрального характера, используя хорошую растворимость фенолов в этиловом эфире и способность их образовывать феноляты при взаимодействии со щелочью. Выделенные фенолы сочетают с диазотированной сульфаниловой кислотой (ДСК) и в виде диазопроизводных подвергают разделению методом бумажной хроматографии. Диазосульфифенолы различаются по окраске и R_f ; это облегчает идентификацию веществ. Для количественного определения фенолов окрашенные пятна их производных вырезают, измеряют оптическую плотность водных элюатов и по калибровочным графикам, построенным для каждого фенола в отдельности, находят концентрацию фенолов в элюате, а по расчетным формулам вычисляют содержание каждого фенола в продукте.

Методика определения [218, 173]. К навеске измельченного продукта 100—200 г, содержащей 2—5 мг фенолов, приливают 10 мл 10%-ной H_2SO_4 , 100 мл дистиллированной воды и отгоняют фенолы с паром на кипящей насыщенной солевой бане.

Собирают 400 мл дистиллята, добавляют 20 г NaCl, 50 мл 10%-ного раствора HCl, перемешивают и в три-четыре приема экстрагируют фенолы этиловым эфиром в делительной воронке, приливая по 75 мл эфира и энергично встряхивая воронку по 50—60 раз.

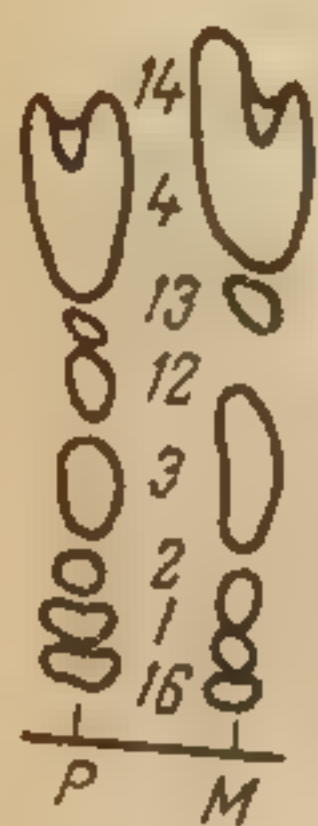
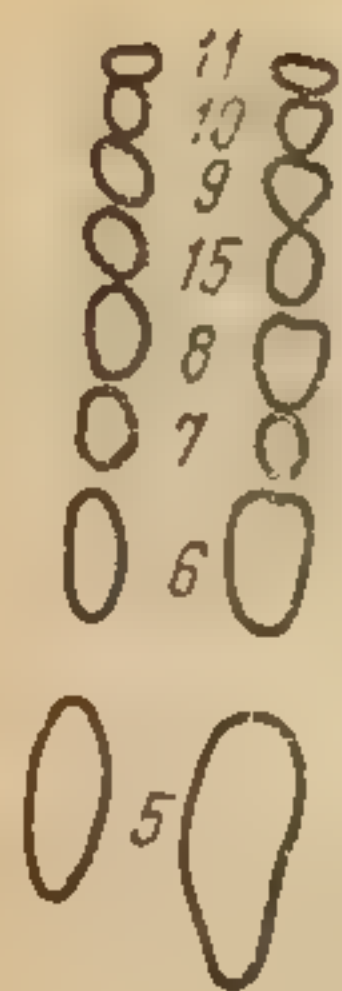
После третьей экстракции остаток не должен содержать фенольных веществ, полноту выделения которых проверяют по реакции с реактивом Гиббса. К 1 мл остатка добавляют 0,5 мл фосфатного буферного раствора с pH 9,2 и несколько капель 1%-ного спиртового раствора 2,6-дихлорхинонхлоримиды или 2,6-дибромхинонхлоримиды. В присутствии фенолов появляется синее окрашивание. Полноту выделения фенолов можно проверить также по реакции с 4-аминоантипирином, приливая к 1 мл остатка 1 мл буферного раствора с pH 10,5 (5%-ный раствор NH_4Cl), 1 мл 8%-ного раствора $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ и несколько капель 2%-ного водного раствора 4-аминоантипирина. В присутствии фенолов появляется красное окрашивание.

К эфирной вытяжке приливают 25 мл 10%-ного раствора HCl и промывают, энергично встряхивая, в делительной воронке. Затем концентрируют в аппарате Сокслета до объема около 50 мл и в три-четыре приема обрабатывают в делительной воронке 5%-ным раствором NaOH, приливая каждый раз по 30 мл раствора щелочи. Первые порции щелочных растворов фенолятов окрашены. Последняя порция должна быть бесцветной. Растворы фенолятов натрия объединяют и по каплям нейтрализуют концентрированной HCl до кислой реакции по лакмусу. При этом феноляты натрия разрушаются.

Нагревшийся раствор охлаждают до комнатной температуры. Фенолы экстрагируют этиловым эфиром, проверяя полноту выделения указанными выше способами. Эфирные вытяжки объединяют и добавляют безводный Na_2SO_4 (по 5 г на каждые 100 мл эфирного раствора), оставляют на 6—8 часов для обезвоживания, затем фильтруют через бумажный фильтр, промывая фильтр эфиром.

Раствор фенолов в эфире концентрируют до объема 2—3 мл и непосредственно перед хроматографированием сочетают с ДСК, приливая точно 0,25 или 0,5 мл свежеприготовленного 2%-ного раствора ДСК в 5%-ном растворе NaOH. Смесь диазосульфифенолов наносят на хроматографическую бумагу калиброванными микропипетками в виде щелочного раствора. Общее содержание фенолов в смеси, наносимой одним пятном на бумагу, должно составлять 0,4—0,6 мг, а количество отдельных фенолов — от 5 до 50 мкг.

Для диазотирования 2 г химически чистой сульфаниловой кислоты растворяют в 30 мл воды и добавляют при помешивании несколько капель 10%-ного раствора Na_2CO_3 до полного растворения кислоты. Реактивный сосуд помещают в лед, добавляют 1 г NaNO_2 и смесь подкисляют концентрированной



НСI до кислой реакции по метилоранжу. Выпавший белый осадок ДСК отсасывают на воронке Бюхнера и быстро промывают небольшим количеством ледяной дистиллированной воды. Осадок отжимают между листами фильтровальной бумаги, подсушивают на воздухе и хранят в темноте. ДСК взрывоопасна!

Используемую для хроматографии бумагу марки «Б» Ленинградской бумажной фабрики предварительно пропитывают Na_2CO_3 , погружая на несколько секунд в 4%-ный раствор, а затем высушивая.

Хроматографическое разделение окрашенных производных фенолов проводят при нисходящем движении подвижного растворителя, которым служит метилэтилкетон, насыщенный водой. Метилэтилкетон

Рис. 16. Хроматограмма фенольного состава (фракции летучих веществ) рыбы (р) и заливки (м) консервов «Шпроты в масле» [119]:

1 — пирокатехин и его производные; 2 — метиловые эфиры пирогаллола и его гомологов; 3 — гваякол; 4 — карболовая кислота; 5 — м- и о-крезолы; 6 — метилгваякол; 7 — п-ксиленол; 8 — м-ксиленол; 9 — β-нафтол; 10 — п-крезол; 11 — о-ксиленол; 12—16 — неидентифицированные фенолы

смешивают с водой в соотношении 1 : 1 и энергично встряхивают несколько минут. После расслоения жидкостей водную фазу используют для насыщения хроматобокса, в который на 10—14 часов помещают полоску бумаги с нанесенными в виде пятнышек азопроизводными фенолов, выделенных из продукта, и химически чистых фенолов-«свидетелей». Хорошие результаты получаются при трехкратном пропускании подвижного растворителя и при использовании полосок бумаги длиной 45—50 см (рис. 16).

Идентифицируют фенолы сравнением со «свидетелями» по окраске пятен диазосульфифенолов на хроматограммах, оптической характеристике элюатов и коэффициентами подвижности R'_f относительно гваякола. В табл. 7 приведены значения R'_f и указана окраска диазосульфифенолов.

Концентрацию фенолов рассчитывают по оптической плотности водных элюатов их диазопроизводных. Для определения оптической плотности растворов азопроизводных карболовой кислоты, гваякола, м- и о-крезолов, м- и п-ксиленолов, пирокатехина и его производных следует пользоваться сине-зеленым светофильтром ФЭКа с максимумом пропускания при 434 нм. Элюаты производных метилгваякола, п-крезола, о-ксиленола, β-нафтола, метиловых эфиров пирогаллола и его гомологов исследуют с зеленым светофильтром при 490 нм. Концентрацию фенолов в элюатах определяют по калибровочным графикам, которые строят отдельно для каждого фенола-«свидетеля» по элюатам азопроизводных химически чистых фенолов.

Таблица 7

Характеристика диазосульфопроизводных фенолов

Фенолы	R_f по гвая- колу	Окраска пятен диазосульфифенолов
Пирокатехин и его производные	0,2—0,4	Красновато-коричне- вая
Метилловые эфиры пирогаллола и его го- мологов	0,4—0,6	Малиновая
Гваякол (метилловый эфир пирокатехина)	1,0	Оранжево-розовая
Фенол (карболовая кислота, оксибензол)	2,0—2,5	Лимонно-желтая
м-крезол и о-крезол (окситолуол)	3,0—3,6	Охристая
Метилгваякол (крезол)	4,0—4,4	Винно-красная
п-ксиленол (2,5-диметил, 1-оксибензол)	4,6—4,9	Охристо-розовая
м-ксиленол (3,4-диметил, 1-оксибензол)	5,0—5,2	Желтая
β-нафтол	5,6—5,8	Кирпично-красная
п-крезол (окситолуол)	5,8—6,0	Розово-желтая
о-ксиленол (3,4-диметил, 1-оксибензол)	6,0—6,2	Кирпично-красная

Количество фенолов в продуктах питания рассчитывают в единицах оптической плотности элюатов для стандартных условий опыта и в $\text{мкг}\%$ для идентифицированных фенолов. Например: навеска продукта 100 г; все количество фенола, выделенное из навески, в виде диазопроизводного растворено в 10 мл элюата; оптическая плотность элюата определена с использованием кюветы, имеющей расстояние между рабочими гранями 10 мм.

Содержание фенолов в единицах оптической плотности элюатов определяют по формуле

$$C = \frac{c \cdot B \cdot 100}{p \cdot b}, \quad (33)$$

где c — оптическая плотность элюата;

B — общий объем щелочного раствора диазосульфифенолов, мл;

b — объем раствора диазосульфифенолов, нанесенного на хроматографическую бумагу для разделения, мл;

p — навеска продукта, г.

Содержание фенолов в $\text{мкг}\%$ рассчитывают по формуле

$$A = \frac{a \cdot V \cdot B \cdot 100}{p \cdot b}, \quad (34)$$

где a — концентрация фенола в элюате, найденная по калибровочному графику, $\text{мкг}/\text{мл}$;

V — объем элюата, мл;

B, b и p — то же, что и в формуле 33.

3.3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ

Сахара экстрагируют из продукта водой или этиловым спиртом, тщательно отделяют примеси. Для очистки вытяжек можно использовать сефадекс [144].

Хроматографическое разделение сахаров на бумаге проводят любым известным способом. При нисходящей одномерной хроматографии моносахаридов и олигосахаридов рекомендуют систему растворителей *n*-бутанол-уксусная кислота-вода в соотношении 4:1:5 [138], при восходящей хроматографии применяют смесь *n*-бутанол-этанол-вода в соотношении 40:11:19 [144]. Хорошие результаты получаются при разделении сахаров с использованием системы этилацетат-уксусная кислота-вода (9:2:2).

Для более четкого разделения сахаров проводят двухмерную хроматографию, при которой в одном направлении пропускают систему *n*-бутанол-пиридин-вода (3:2:1,5), а в другом — фенол, насыщенный водой [237]. Разделение глюкозы, фруктозы и сахарозы хорошо происходит при использовании двух систем растворителей: бензол-*n*-бутанол-пиридин-вода (1:5:3:3) и амиловый спирт-пиридин-вода (1:1:2).

Для качественного и количественного определения сахаров высушенные хроматограммы обрабатывают растворами проявителей. Альдозы проявляют анилифталатным или анилин-дифениламинофосфатным реактивом, кетозы — раствором мо-чевины. Количество сахаров обычно рассчитывают по оптической плотности элюатов, используя калибровочные графики, построенные отдельно для каждого сахара. Применяют также денситометрический метод. Методики определения сахаров пищевых продуктов способом бумажной хроматографии подробно изложены в литературе [138, 144, 201, 247].

3.3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Бумажная хроматография аминокислот, широко распространенная в прошлом десятилетии, теперь вытесняется более удобной и менее трудоемкой ионообменной хроматографией с использованием автоматических аминокислотных анализаторов. Однако благодаря своей доступности хроматография на бумаге не потеряла значения в практике лабораторного анализа [112, 173, 201].

Выделение свободных аминокислот и получение белковых гидролизатов пищевых продуктов изложены на стр. 152, 153. Для разделения аминокислот обычно применяют отечественную хроматографическую бумагу марки «М» или импортную бумагу ватман марок 1, 2, 3, 3ММ. Так как бумага может содержать примеси, в частности ионы тяжелых металлов, образующие соли с аминокислотами, перед использованием в хроматографии

ческом анализе бумагу рекомендуется пропитать 0,02%-ным раствором 8-оксихинолина, подкисленным уксусной кислотой. Высушенную бумагу промывают нисходящим способом подвижным растворителем до полного удаления темных комплексов 8-оксихинолина с металлами.

Исследуемый раствор, содержащий по несколько мкг каждой аминокислоты, наносят на бумагу в виде пятнышек или штрихов длиной по 2,0—2,5 см. Рядом на этот же лист бумаги наносят 0,05М растворы стандартных аминокислот. Для определения цистина и цистеина, а также при использовании в качестве проявителя изатина содержание аминокислот в смеси, наносимой на бумагу, должно быть выше в 2—3 раза. Стандартные аминокислоты наносят на бумагу в виде смесей, каждая из которых содержит по 5—7 веществ. Например: лейцин+тирозин+треонин+аспарагиновая кислота+лизин+цистеин; триптофан+пролин+валин+аланин+глицин+аргинин+орнитин+фенилаланин+метионин+глутаминовая кислота+серин+гистидин+цистин. При составлении смесей стандартных аминокислот учитывают степень разбавления растворов для расчета концентрации каждой аминокислоты в смеси.

В целях более быстрой и точной идентификации аминокислот целесообразно ставить одновременно несколько дубликатов хроматограмм с разным количеством исследуемой смеси аминокислот, а также применяя различное время разгона аминокислот и разные проявители: нингидрин и изатин. Благодаря высокой чувствительности нингидрин (трикетогидриндегидрат) позволяет открывать незначительные количества аминокислот в объектах исследования. Продукты реакции изатина и аминокислот имеют неодинаковую окраску, позволяющую безошибочно идентифицировать аминокислоты.

Разделение аминокислот можно проводить одномерной хроматографией восходящим или нисходящим способами, но при нисходящей хроматографии не всегда получаются достаточно четкие пятна. Подвижным растворителем при одномерной хроматографии служит верхний слой смеси н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:5). Для разделения быстро движущихся аминокислот (лейцина, фенилаланина, триптофана, метионина, валина, тирозина) достаточно 2—3-кратного подъема растворителя. Чтобы лучше разделить аминокислоты со средней и малой подвижностью, можно 6—7 раз пропускать растворитель.

При двухмерной хроматографии используют две системы растворителей, например в одном направлении — фенол, насыщенный водой, в другом — н-бутанол-уксусную кислоту-воду (4:1:5). Более четкого разделения аминокислот можно добиться применением забуференной бумаги [112].

Высушенные хроматограммы обрабатывают растворами проявителей: 0,2%-ным раствором нингидрина в ацетоне и

1,0%-ным раствором изатина в ацетоне с добавлением 4 мл уксусной кислоты на каждые 100 мл раствора.

При обработке нингидрином на хроматограмме проявляются сиреневые пятна дикетогидриндидидикетогидриндамина (ДИДА). Пролин окрашивается в желтый цвет. Окраска пятен развивается медленно и достигает наибольшей интенсивности при комнатной температуре через 10—16 часов. При 100°С окраска развивается быстро, но пятна становятся диффузными, а фон розовым. После идентификации аминокислот хроматограмму закрепляют путем смачивания раствором азотной кислоты и 100 мл ацетона). При этом пятна приобретают оранжево-красную окраску вследствие образования медных производных ДИДА.

При обработке изатином на хроматограмме быстро проявляется ярко-синее пятно пролина. Для обнаружения других аминокислот хроматограмму нагревают 10—20 мин при 90—100°С. На оранжевом фоне появляются пятна различной окраски. Триптофан при этом не проявляется. Чтобы проверить правильность идентификации аминокислот, хроматограмму можно отбелить, смазав смесью силикатного клея с 20%-ным раствором Na_2CO_3 (3:1) и высушив при 50°С. Фон становится бледно-лимонным, и многие пятна изменяют окраску. Триптофан проявляется в виде ярко-красного пятна.

Содержание аминокислот в объектах исследования определяют по интенсивности окраски продуктов реакции их с нингидрином или продуктов реакции ДИДА с ионами меди, кадмия, ртути. Пятна медных производных ДИДА элюируют 75%-ным этиловым спиртом в течение 1,5—2 ч в темном месте и измеряют оптическую плотность элюатов при 490 нм. Контрольным раствором служит элюат из чистых участков этой же хроматограммы. Количество каждой аминокислоты (в мг%) можно рассчитать по формуле

$$X = \frac{E_{\text{исп}} \cdot C_{\text{ст}} \cdot A \cdot 100}{E_{\text{ст}} \cdot a \cdot p}, \quad (35)$$

где $E_{\text{исп}}$ — оптическая плотность элюата испытуемой аминокислоты;

$C_{\text{ст}}$ — количество стандартной аминокислоты в пятне, мг;

A — общий объем раствора смеси аминокислот, выделенных из продукта, мл;

$E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность элюата стандартной аминокислоты;

a — нанесенный на хроматограмму объем раствора смеси испытуемых аминокислот, мл;

p — навеска продукта, г.

3.4. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (ТСХ)

3.4.1. ОСНОВЫ МЕТОДА

Принцип метода

С точки зрения методических особенностей эксперимента ТСХ является наиболее простым методом хроматографии, сочетающим такие качества, как универсальность, высокая чувствительность, быстрота и простота выполнения анализа. Благодаря этим качествам, а также несложности оборудования, наглядности, четкому разделению веществ и надежности их идентификации метод ТСХ открывает широкие возможности для анализа пищевых продуктов.

Началом метода была работа советских исследователей Н. А. Измайловой и М. С. Шрайбера, которые еще в 1938 г. описывали принцип ТСХ на стеклянных пластинках, покрытых тонким слоем алюминия (впервые разделив алкалоиды лекарственных растений). Но систематическое внедрение этого аналитического метода является заслугой немецкого ученого Э. Шталя, который заложил основу современной ТСХ и дал математическое обоснование этому методу [205]. Начиная с 1958 г. ТСХ развивалась очень быстро. За короткое время ТСХ вошла в практику современных аналитических лабораторий. Этим методом исследуют липиды, глюкоиды, аминокислоты, нуклеотиды, сахара, фенолы, гормоны, витамины, алкалоиды и другие соединения.

Вопросы теории ТСХ и техники работы изложены в ряде монографий и работ [15, 36, 162, 205].

ТСХ можно рассматривать как разновидность метода бумажной хроматографии. Вместо свободно свисающих полос бумаги используют стеклянные пластинки, на которые тонким слоем наносят подходящий сорбент. На такой слой (так же как на бумагу в бумажной хроматографии) на стартовую линию наносят анализируемую смесь веществ, а край пластинки ниже стартовой линии погружают в систему растворителей. По мере продвижения жидкости по пластинке происходит разделение смеси веществ благодаря действию сил адсорбции, распределения, ионообмена или совокупности действия всех перечисленных факторов.

Сорбенты для ТСХ

В настоящее время в ТСХ применяют главным образом следующие сорбенты: для разделения липофильных веществ — силикагель, окись алюминия, ацетилованную целлюлозу, полиамиды; для разделения гидрофильных веществ — целлюлозу, ионообменники целлюлозные, кизельгур, полнамиды и др. [126].

Силикагель наиболее часто используют в ТСХ как сорбент, обладающий высокой емкостью и хорошей разделяющей способностью, имеющий широкий диапазон применения (практически все классы соединений можно разделить на нем). К тому же силикагель инертен по отношению к наиболее неустойчивым веществам, что обеспечивает его стабильность в различных препаратах, а хорошая адгезия его к стеклу дает возможность получать тонкие, ровные и механически прочные слои.

Большинство силикагелей, используемых для ТСХ, классифицируются как крупнопористые.

Силикагель адсорбирует ненасыщенные, ароматические или полярные молекулы благодаря образованию водородных связей. Двойные связи углерод-углерод на силикагеле адсорбируются слабее, чем на других полярных адсорбентах. Поэтому ароматические углеводороды и соединения, отличающиеся только по относительной степени ненасыщенности, лучше разделяются на других полярных адсорбентах. Поэтому ароматические углеводороды и соединения, отличающиеся только по относительной степени ненасыщенности, лучше разделяются на других полярных адсорбентах, например окиси алюминия.

Хорошие результаты получают с силикагелем марки КСК (воскресенского и башкирского заводов), размолотым и просеянным через сито 150—200 меш (величина отверстия сита соответственно 0,10 или 0,07 мм), отмытым (в случае необходимости) от примесей железа.

Один из способов подготовки силикагеля КСК как адсорбента для ТСХ заключается в следующем [33]. Силикагель КСК размалывают в шаровой мельнице в течение 6 ч. Для этого в барабан, содержащий 250 фарфоровых шаров, засыпают 400 г гранулированного силикагеля и добавляют 200 мл дистиллированной воды для меньшего пыления. После окончания размалывания содержимое барабана переносят на алюминиевое сито № 10 и встряхиванием вручную отделяют фарфоровые шары. Размолотый силикагель помещают на капроновое сито № 11, снизу к нему присоединяют капроновое сито № 43. Собранный комплект сит с поддоном и крышкой ставят на качалку на 30 мин для отсеивания цельных гранул и обломков силикагеля. Сорбент, собравшийся в поддоне, переносят на капроновое сито № 73, снизу присоединяют капроновое сито № 76, поддон закрывают крышкой и устанавливают для просеивания в стойки вибратора на 75 мин, что обеспечивает максимальный выход фракции (183—195 меш).

Сорбент, который находится между ситами № 73 и 76 (183—195 меш), собирают и хранят в склянке с притертой пробкой.

Для ТСХ часто необходим сорбент, который не содержал бы примесей тяжелых металлов и органических веществ. Так, при-

меси железа в силикагеле могут катализировать окисление жирных кислот, производить изомеризацию некоторых органических соединений. Примеси железа можно удалить кипячением силикагеля с соляной кислотой в колбе с обратным холодильником или в аппарате Сокслета. Часто силикагель кипятят с концентрированной HCl в колбе с обратным холодильником в течение 2 ч, меняя кислоту каждые 30 мин. Кислоту декантируют, силикагель отмывают на стеклянном фильтре № 2 от ионов Cl 3,5 л дистиллированной воды, промывают 600 мл метанола и 600 мл серного эфира. Пары растворителей из силикагеля удаляют в вытяжном шкафу. Затем силикагель помещают на стекло слоем 1 см и сушат в термостате при 110°С в течение 2 ч для стандартизации содержащейся в нем воды. Чистый силикагель хранят в склянке с притертой пробкой до использования.

Работу можно проводить с силикагелем других марок, специально приготовленным для ТСХ. Получил распространение силикагель следующих марок: с добавкой гипса ~13%—G (ФРГ), H (ФРГ), LS 5/40 (ЧССР), с люминесцентным индикатором—LL₂₅₄ 5/40 (ЧССР), GF₂₅₄, без добавок к сорбенту—Merck (ФРГ), Woelm (ФРГ)—[126].

Хроматографические свойства силикагеля изменяются в широких пределах в зависимости от метода его получения и последующей термической обработки.

Окись алюминия после силикагеля является наиболее распространенным адсорбентом. Как и силикагель, это полярный адсорбент, и порядок элюирования разделенных веществ на этих двух сорбентах в общем одинаков. Свойства этого сорбента можно изменять соответствующим подбором растворителей и добавлением определенных веществ, что позволяет использовать его для разделения различных соединений. Окись алюминия может выполнять роль адсорбента и ионообменника (щелочная окись алюминия является катионообменником, а окись алюминия, обработанная кислотой,—анионообменником).

Активность окиси алюминия зависит от ее влагосодержания, что имеет практическое значение для хроматографии, так как, увлажняя наиболее активную форму окиси алюминия различным количеством воды, можно получить набор адсорбентов с различной емкостью. При нагревании гидратированной окиси алюминия до 300–400°С большая часть адсорбированной воды удаляется. Такая окись алюминия обладает наибольшей адсорбционной активностью и обозначается по Брокману как окись алюминия I. Для получения сорбента нужной активности (II, III, IV, V) к окиси алюминия I (обезвоженный сорбент) добавляют соответствующее количество воды (3, 6, 10 и 15%), смесь встряхивают в банке с хорошо притертой пробкой в течение 5–10 мин и оставляют на 6–8 часов.

Окись магния является полярным адсорбентом основного характера, наиболее применимым для разделения веществ,

которые различаются только по степени ненасыщенности поли-
ядерных ароматических соединений.

Кизельгур рекомендуется для разделения полярных ве-
ществ. Он выполняет главным образом роль носителя при ра-
боте распределительным методом.

В ТСХ используются модифицированные сорбенты,
которые получают путем пропитки адсорбента материалом, об-
разующим комплексы со специфичными органическими функци-
ональными группами. Пропитанный нитратом серебра силика-
гель применяют для разделения ненасыщенных соединений,
поскольку они способны образовывать с ионами серебра π -комп-
лексы, менее подвижные, чем насыщенные соединения того же
класса [6, 176].

Широко используются различные целлюлозы [178]. По-
рошкообразную целлюлозу можно получить в лаборатории из
хроматографической бумаги. Для этого бумагу измельчают на
кусочки по 5—8 мм, высушивают при 60—70°С в течение 18—
20 ч и помещают в колбу емкостью 1 л, приливают 500 мл
96%-ного этилового спирта и 120 мл концентрированной HCl.
Смесь кипятят с обратным холодильником в течение 1,5—2 ч
и отфильтровывают в горячем виде на воронке Бюхнера. Оста-
ток промывают на фильтре несколько раз дистиллированной во-
дой, переносят в двухлитровый стакан и многократно промы-
вают водой до нейтральной реакции и до отрицательной реак-
ции на ион хлора. Тщательно промытый остаток смешивают
с 700 мл 90—92%-ного этилового спирта, переносят все на во-
ронку Бюхнера, спирт отсасывают, а остаток высушивают в тер-
мостате при 60—70°С. Высушенную массу измельчают (на
мельнице «Пируэт») и просеивают сквозь сито 130—200 мкм.
При этом из 80 г хроматографической бумаги можно получить
около 50—70 г порошкообразной целлюлозы для ТСХ.

В ТСХ находят применение также полиамидные по-
рошки, ионообменные смолы, сефадексы и др. Важ-
нейшие свойства сорбентов (с указанием марок и фирм, их
производящих) рассмотрены в литературе [126].

Выбор подвижной жидкой фазы и условий разделения

Для успешного разделения веществ с помощью ТСХ важное
значение имеет выбор сорбента и соответствующего раствори-
теля. Правильно выбранный растворитель усиливает раздели-
тельную способность сорбента. Обычно в ТСХ применяют си-
стемы растворителей, состоящие из двух, трех и более компо-
нентов. Однако применение многокомпонентных систем может
вызвать ряд нежелательных явлений, например образование
нескольких фронтов и так называемый «краевой эффект».

Образование нескольких фронтов вызывается разделением
системы растворителей во время хроматографирования в тех

случаях, когда смесь состоит из растворителей с сильно различающимися полярностями.

«Краевой эффект» выражается в искривлении фронта растворителя. Он является результатом неравномерного испарения растворителя с середины пластинки и ее краев. Поэтому R_f соединений уменьшается от середины к краям пластинки.

Выбор растворителя, как правило, производится эмпирически с учетом полярности разделяемых компонентов и полярности растворителей. Отправной точкой для оценки полярности растворителей может служить элюотропный ряд Шталя, составленный на основании элюирующей способности растворителя. Так, в адсорбционной ТСХ можно использовать, например, следующий ряд, в котором растворители расположены в порядке возрастания элюирующей силы: гексан, гептан, циклогексан, четыреххлористый углерод, бензол, хлороформ, эфир, этилацетат, пиридин, ацетон, этанол, метанол, вода.

Вещества с липофильным характером разделяются на полярном адсорбенте с малополярным растворителем, таким, как петролейный эфир, бензин, бензол. Чтобы выбрать необходимую подвижную фазу, часто в качестве основного растворителя берут неполярный и прибавляют к нему небольшое количество полярного растворителя.

Растворитель элюирует органические соединения из сорбента в зависимости от строения вещества, а также от типа и числа функциональных групп в нем. Разделение методом адсорбционной ТСХ происходит в соответствии с правилами, сформулированными Брокманом. Углеводороды являются мало адсорбируемыми или совсем неадсорбируемыми веществами, и поэтому они передвигаются с фронтом растворителя. Наличие одной или нескольких двойных связей, особенно сопряженных, увеличивает адсорбционную способность соединений. Эфиры адсорбируются слабо. Альдегиды падаются впереди спиртов и кислот. Ненасыщенные соединения адсорбируются сильнее насыщенных. Соединения с короткими цепями адсорбируются сильнее соединений с длинными цепями. Введение функциональной группы увеличивает сродство с адсорбентом.

Адсорбционная способность функциональных групп увеличивается в следующем порядке: $\text{CH}=\text{CH} < \text{OCH}_3 < \text{COOR} < < \text{C}=\text{O} < \text{CHO} < \text{SH} < \text{NH}_2 < \text{OH} < \text{COOH}$ [15, 205].

Специально разработанный для липофильных веществ метод ТСХ на силикагеле казался менее пригодным для гидрофильных соединений. Но силикагель, как и целлюлоза, содержит в зависимости от метода высушивания воду набухания и сольватную воду, поэтому он также может быть использован в распределительной ТСХ для разделения веществ даже с резко выраженными гидрофильными свойствами и мало растворимыми в органических растворителях. Таким образом, при разделении методом распределительной ТСХ неподвижной фазой обычно

служит вода, а подвижной — не смешивающийся с ней, менее полярный органический растворитель, к которому добавляют воду или который насыщают водой. При подборе растворителей для распределительной хроматографии всегда следует иметь в виду обе жидкие фазы.

При выборе растворителя в распределительной ТСХ также можно пользоваться каким-либо из известных рядов [205], в котором растворители расположены по их склонности к образованию водородных связей. В начале такого ряда стоят гидрофильные соединения (полярные) с наиболее ярко выраженными способностями к образованию водородных связей, а в конце — гидрофобные соединения (липофильные, или неполярные). Так, для анализа свободных аминокислот методом распределительной ТСХ используют растворители, содержащие воду, и при этом применяют сильно полярные жидкости, например метанол, этанол, ацетон и др.

Для разделения гидрофобных веществ можно применять распределительную ТСХ с «обращенной» фазой. В этом случае слой носителя пропитывают липофильными веществами, такими, как ундекан, парафиновое масло, силиконовые масла различной вязкости и др. Подвижной фазой служат полярные органические растворители, которые обычно насыщают неподвижной фазой.

На практике для выбора требуемого растворителя рекомендуется провести пробное хроматографирование анализируемой пробы вещества в тонком слое на предметных стеклах для микрокопирования. Для этого два предметных стекла, соединенные плоскостями, опускают в суспензию адсорбента, состоящую, например, из 35 г силикагеля в 100 мл раствора хлороформа с метанолом (в соотношении 2:1) и хранящуюся в высокой стеклянной банке с притертой пробкой. Стекла вынимают, разделяют и дают им высохнуть. Затем наносят на них 2 мкл 1%-ного раствора образца и разделяют растворителем с низкой элюирующей силой, что обычно занимает 2—3 мин. После этого пластинки сушат, а хроматограммы проявляют, помещая их, например, в камеру с парами йода. Эксперимент повторяют, используя растворители со всевозрастающей силой, и применяя, если необходимо, бинарные смеси до тех пор, пока значения R_f для представляющих интерес компонентов не будут находиться в пределах от 0,3 до 0,8.

Подготовка пластинок для ТСХ

Практически выполнение ТСХ начинается с подготовки пластинок.

Выбор подложки. Пластины для ТСХ могут быть из стекла, алюминиевой фольги или пластмассы.

Можно использовать пластинки из любого стекла (фотопластинку со смытой эмульсией, стекло зеркальное, пирекс,

обычное оконное стекло) и различных размеров. Часто применяют фотопластинки размером 13×18 см. Для препаративного разделения используют стекла шириной 30–40 см и длиной 40–50 см. Для хроматографирования на «микропластинках» служат предметные стекла ($2,5 \times 7,6$ см). Э. Шталь рекомендует для стандартизации условий проведения опыта пластинки размером 20×20 и 20×10 см.

Поверхность пластинки перед нанесением сорбента должна быть тщательно вымыта, обезжирена и высушена.

Приготовление сорбционной массы. Тонкий слой сорбента на пластинке может быть как незакрепленным, свободно насыпанным, так и закрепленным с помощью какого-либо связующего агента (обычно гипса или крахмала).

Пластинки с закрепленным слоем чаще применяют для аналитических целей, они более удобны в употреблении, отличаются равномерностью распределения сорбента.

Сорбент наносится на пластинку в виде водной суспензии [15, 36, 205]. Наиболее часто применяемые на практике методики приготовления сорбционной массы следующие.

Силикагель марки КСК с гипсом (для пяти пластинок размером 20×20 см) — [33]. 25 г очищенного силикагеля и 2 г гипса перемешивают стеклянной палочкой в стакане емкостью 250 мл в течение 1 мин, добавляют 65 мл дистиллированной воды. В стакан помещают круглую насадку от электромиксера и массу перемешивают 1,5 мин до получения равномерной суспензии. При отсутствии электромиксера суспензию силикагеля в воде готовят в большой фарфоровой ступке, предварительно тщательно перемешав силикагель с гипсом в течение 15 мин стеклянной палочкой в химическом стакане.

Силикагель марки КСК с гипсом (для одной пластинки размером $11 \times 17,5$ см с толщиной слоя около 300 мкм) — [15]. 6,9 г силикагеля, 0,35 г медицинского гипса и 18 мл воды встряхивают в конической колбе емкостью 100–150 мл с притертой пробкой в течение 1–2 мин. Полученную суспензию наносят на пластинку.

Силикагель G, окись алюминия G и кильзегур G (с 5% гипса) фирмы «Мерк» (для пяти пластинок размером 20×20 см при толщине слоя 250 мкм) — [36, 205]. 25 г сорбента насыпают в сухую фарфоровую ступку диаметром примерно 10 см. При медленном перемешивании добавляют вначале 35 мл дистиллированной воды и растирают до образования однородной массы, не содержащей пузырьков воздуха и комков. После этого также при перемешивании добавляют еще 15 мл дистиллированной воды. Суммарное время перемешивания не должно превышать 1,5–2 мин. Затем быстро наносят слой на пластинку.

Порошки целлюлозы (для пяти пластинок размером 20×20 см) — [15]. Для получения хорошего ровного слоя перед

нанесением на пластинку суспензии из целлюлозы, содержащей и не содержащей гипс, ее необходимо тщательно перемешать электрической мешалкой в течение примерно 1 мин: тип MN-300G — 15 г порошка и 90 мл дистиллированной воды; тип MN-300G/A_c — 10 г порошка и смесь из 50 мл метанола и 5 мл дистиллированной воды. Намазанные пластинки сушат 5—10 мин при 60° С.

Порошкообразная целлюлоза, приготовленная из хроматографической бумаги (для четырех пластинок размером 13×18 см) — [178]. 5 г целлюлозы смешивают с 30 мл воды в микронизмельчителе тканей в течение 5—8 мин. Для высушивания пластинки оставляют на воздухе на 6—8 часов.

Для получения пластин хорошего качества необходимо получить полностью суспензированный раствор. Если в суспензии образуется осадок, то это приведет к тому, что на пластинке после высушивания толщина слоя адсорбента будет разной.

Слой сорбента должен обладать капиллярной структурой, благоприятной для перемещения растворителя, должен быть ровным, иметь толщину около 250 мкм и в то же время слой должен обладать механической прочностью, достаточной для того, чтобы не происходило его отставание в процессе хроматографирования.

Нанесение слоя сорбента на пластинки. Для нанесения на пластинки незакрепленных тонких слоев порошок твердых веществ насыпают на стекло (лучше матовое) и разравнивают валиком из нержавеющей стали или стеклянной трубкой с надетыми на концы кусочками каучука, толщина которых должна соответствовать толщине слоя получаемого сорбента (обычно 1 мм).

Известны следующие способы нанесения закрепленного слоя сорбента (из подготовленной предварительно сорбционной массы): намазывание суспензии на пластинки; погружение пластинок в суспензию; опрыскивание с помощью распылителей.

Наиболее распространен способ намазывания пластинок вручную или с применением специальных приборов. Необходимое количество суспензии наливают на пластинку и разравнивают слой, держа пластинку в руке, наклоняя ее в разные стороны и распределяя слой с помощью шпателя или стеклянной палочки. Рекомендуются также предварительно по краям пластинок нанести узкой полосой сорбционную массу с помощью стеклянной палочки, погружая ее в суспензию, а затем вылить остальную массу на пластинку и разровнять по всей поверхности, встряхивая на ладони [36].

Из приборов для нанесения тонких слоев наиболее распространен аппликатор Шталя, выпускаемый фирмой «Дезага» [15, 205]. При получении закрепленного слоя можно пользоваться и другими приспособлениями, например прибором Шан-

дона (прибор входит в комплект аппаратуры для тонкослойной хроматографии, выпускаемой заводом «Дружная горка»).

Высушивание и хранение пластинок. После нанесения слоя сорбента пластинки обычно высушивают, оставляя на горизонтальной поверхности (на столике с переменным наклоном для установки по уровню) на 3—24 часа. В некоторых случаях при использовании окиси алюминия или окиси магния пластинки не высушивают, а поэтому нанесение сорбента производится непосредственно перед хроматографированием. Пластины с силикагелем активируют нагреванием при 110°C для стабилизации содержащейся в них воды.

Готовые пластинки хранят в специальном шкафу из органического стекла с плотно пригнанными дверцами (или эксикаторе) над хлористым кальцием или силикагелем (для удаления воды).

Пластины с готовым слоем. Некоторые фирмы изготавливают стандартные хроматографические пластинки со слоем сорбента различной, но строго постоянной толщины (силикагель, целлюлоза, ионообменная смола), на стекле или других подложках (из алюминиевой фольги, пластмассы, пропитанного стекловолокна). Удобны в работе пластины с силикагелем для ТСХ: силуфольные (фирмы «Serva» — ФРГ и «Kav» — ЧССР), приготовленные на алюминиевой фольге, укрепленной картоном, с крахмалом в качестве связующего, с добавлением и без флуоресцентных индикаторов; истмановские листы (фирмы DPL — США и Kodak — Франция) на полиэтилентерефталатной пленке (0,17 мм) с поливиниловым спиртом и др. [126].

Несмотря на большие преимущества готовых пластинок, при работе с некоторыми из них можно применять не все реактивы при проявлении, так как они могут вступать в реакцию с подложкой или связующим веществом. Пластмассовые листы нельзя нагревать при температуре выше примерно 130°C , и, таким образом, исключается проявление хроматограмм методом обугливания. Силуфольные пластины в качестве подложки имеют картон и фольгу, что исключает возможность использования растворителей, содержащих воду, а наличие в них крахмала как связующего вещества не позволяет проводить идентификацию парами йода.

Нанесение пробы

Пробы анализируемых веществ наносят на пластинки в виде 0,1—10%-ных растворов в неполярном летучем растворителе. Растворитель должен быть неполярным (чтобы уменьшить размывание пятна в точке нанесения образца) и летучим (с температурой кипения ниже 120°C , чтобы до начала проявления он мог быстро испариться). Пробу наносят капилляром, специально калиброванным, или микропипеткой в виде серии пятен

с равными интервалами либо в виде сплошной линии, расположенной на 1,5 см от нижнего края пластинки. При нанесении раствора пробы следует избегать разрушения поверхности сорбента. Диаметры пятен должны быть от 2 до 4 мм, а расстояние между центрами пятен 10—15 мм.

Главным источником ошибки в количественном анализе при проведении ТСХ является невозможность нанесения постоянного объема раствора на слой сорбента. Поэтому площадь пятен на старте должна быть одинаковой. Раствор наносят по каплям. Для удаления растворителя удобно применять фен. При количественном анализе исследуемый образец и раствор «свидетелей» наносят на одну пластинку. При этом необходимо нанести одинаковые объемы в одном и том же растворителе и примерно одинаковой концентрации растворов анализируемого вещества и «свидетелей» [162, 211].

Хроматографирование (разделение) вещества на пластинке

Разделение веществ проводят в герметично закрытой камере. Чаще всего хроматографирование осуществляют восходящим способом, когда подвижная фаза поднимается через слой вверх с помощью капиллярных сил.

Камеры, применяемые в ТСХ, по конструкции близки к камерам для хроматографирования на бумаге и отличаются от них в основном размерами. Обычно пользуются прямоугольными камерами с утолщенными краями и плотно пришлифованными стеклянными крышками. Можно использовать стеклянные батарейные стаканы, банки или цилиндры с плоским дном и пришлифованными крышками.

Известны камеры специальных конструкций, например так называемая Сэндвич-камера (или С-камера), где покровная пластинка вместе с пластинкой, на которую нанесен слой, образует прямоугольный бак [162].

Необходимо следить, чтобы камера была насыщена парами растворителя. Это достигается следующим образом: лист фильтровальной бумаги помещают в хроматографическую камеру так, чтобы бумага касалась широких стенок камеры и дна, тщательно смачивают растворителем путем встряхивания и оставляют на 30 мин.

При методе восходящей хроматографии в незакрепленном слое сорбента процесс хроматографии проводят в кристаллизаторе подходящего размера, закрытом шлифованным стеклом [15].

Край пластинки ниже стартовой линии помещают в подвижный растворитель (или смесь растворителей), налитый в камеру. Слой растворителя в камере около 0,5 см, глубина погружения пластинки 5—8 мм. Подъем подвижной фазы по слою сорбента не должен превышать 10—11 см, так как при большем пробеге

наблюдается сильное замедление продвижения жидкости и диффузия пятен, а как следствие — большие колебания величины R_f [205]. После подъема растворителя на указанную высоту пластинку вынимают, отмечают линию фронта, затем сушат в вытяжном шкафу, удаляя подвижную фазу.

В случае разделения веществ, имеющих очень близкие R_f , применяют многократную хроматографию в одном и том же растворителе.

Если не все вещества смеси разделяются в одной системе, то проводят ступенчатое хроматографирование в разных системах растворителей.

В любом варианте растворитель, продвигаясь по стационарной фазе, переносит вещества или молекулы раствора с различными скоростями в направлении движения потока, за счет чего и происходит разделение смеси.

Положение разделенных веществ, если они не окрашены, обычно определяют, рассматривая хроматограмму в ультрафиолетовом свете или опрыскивая ее окрашивающими реактивами.

Способы идентификации

Обычный способ определения положения бесцветных разделенных веществ на хроматограмме состоит в опрыскивании пластинки растворами реактивов, которые могут химически взаимодействовать с разделенными веществами.

Опрыскивают хроматограммы из пульверизаторов различных конструкций в вытяжном шкафу. Слой следует опрыскивать равномерно, по возможности минимальным количеством проявляющего реактива, который должен быть диспергирован до очень мелких капель. После опрыскивания пластинку для проявления пятен иногда нагревают до 100—150°С в сушильном шкафу или выдерживают в специальных камерах в парах аммиака либо под ИК-лампой.

Большинство проявителей, применяемых при бумажной хроматографии, могут быть использованы и для ТСХ. Можно выделить два типа проявителей: общего назначения, взаимодействующие с целым рядом соединений различного типа, и специфического назначения, указывающие на присутствие данного соединения или данной функциональной группы.

Одним из универсальных проявителей в ТСХ являются пары йода. Пластику помещают в закрытую банку, содержащую несколько кристаллов йода. Пары йода растворяются в большинстве органических соединений, которые становятся заметными в виде коричневых пятен на бледно-желтом фоне. Во многих случаях после обнаружения пятен йод можно испарить и пластинку еще раз опрыскать другим реактивом.

Опрыскивание хроматограмм 5%-ным раствором фосфорномолибденовой кислоты в спирте с последующим недолгим

нагреванием до 110°C дает темно-голубые пятна на желтом фоне. Реактив вступает в реакцию с большим числом органических соединений, окраска очень стабильна. Хорошо разделенные пятна, выявленные этим реактивом, вполне подходят для количественного анализа.

Из специфических проявителей используют о-данилизидин или 2,4-динитрофенилгидразин (для обнаружения альдегидов), бромкрезоловый зеленый (для обнаружения кислот) и др. Список реактивов, используемых для обнаружения веществ в ТСХ, имеется в литературе [15, 152, 205].

Помимо опрыскивания различными индикаторами, специфика сорбента позволяет использовать дополнительные приемы проявления — интенсивное нагревание, действие концентрированных кислот (серной, фосфорной) и другие, применение которых затруднительно в бумажной хроматографии.

Для обнаружения веществ, поглощающих в УФ-области спектра, удобно применять слои сорбента, которые содержат флуоресцирующие вещества, или опрыскивать хроматограмму после разделения смеси раствором флуоресцирующего вещества. При облучении пластинки УФ-светом вещества, поглощающие в этой области спектра, обнаруживаются в виде темных пятен цветов различных оттенков. Такой способ идентификации не вызывает разрушения веществ и поэтому особенно эффективен для количественных определений и препаративной хроматографии при экстракции вещества с пластинки.

Положение пятна разделенного вещества описывается посредством измерения величины R_f как отношение расстояния, пройденного веществом от точки старта, к расстоянию, пройденному подвижной фазой от точки старта.

Величины R_f [205] в ТСХ в сильной степени зависят от колебаний в условиях проведения опыта. Поэтому при хроматографическом разделении в тонком слое рекомендуется использовать эталонные вещества («свидетели»), которые наносят наряду с анализируемыми пробами на одну и ту же пластинку.

Количественный анализ в ТСХ

Методы количественной оценки тонкослойных хроматограмм подробно описаны в литературе [211].

Количественное определение разделенных на пластинке веществ проводят измерением площадей пятен или фотоденситометрированием их. Кроме того, метод ТСХ позволяет осуществлять идентификацию веществ простой десорбцией с участка слоя, содержащего пятно, с последующим анализом любым химическим или физико-химическим методом, что имеет большое преимущество перед бумажной хроматографией. При этом способе отделяют слой сорбента на том участке, где была адсорбция вещества. Обычно сорбент по контурам проявленного пятна

счищают шпателем или используют «вакуумный очиститель» (аспиратор) и другие специальные устройства для элюирования веществ из зон хроматограмм и количественно переносят в сосуд, в котором проводят экстракцию. Сорбент отделяют фильтрованием или центрифугированием.

Анализ полученного элюата может быть выполнен весовым определением, методами спектрофотометрии, колориметрии, флуоресценции, полярографии, радиометрии и другими методами.

При весовом методе непосредственно взвешивают остаток после улетучивания элюирующего растворителя. Весовой метод является быстрым и удобным, а также наиболее распространенным при количественном определении фракций липидов различных пищевых продуктов.

При использовании спектрофотометрических методов вещество вымывают чистым летучим растворителем в круглодонную стеклянную колбу емкостью 5—10 мл, из которой растворитель удаляют осторожным испарением на водяной бане в токе азота или роторном испарителе. Вещество вновь растворяют, но в таком растворителе, который не препятствует дальнейшему спектрофотометрическому определению. Раствор приводят к определенному объему и исследуют на соответствующем спектрофотометре или колориметре. Концентрацию разделенного вещества в анализируемом образце определяют по коэффициенту поглощения или по калибровочным кривым.

Спектрофотометрические методы имеют определенные преимущества, которые заключаются в том, что идентификация разделенного вещества может быть подтверждена его собственным пиком поглощения.

Метод ТСХ позволяет не только определить количественный состав смеси, но и препаративно выделять индивидуальные вещества, что имеет большое значение и дает возможность использовать его в сочетании с другими методами. Фракции, полученные в результате разделения на тонком слое, можно подвергнуть дальнейшему исследованию другими хроматографическими методами. Так, для определения жирнокислотного состава липидных фракций (разделенных методом ТСХ) применяют метод ГЖХ [4, 7, 188].

Для этих целей объем пробы образца может быть увеличен. Наносить ее следует в виде узкой полосы, используя более толстые слои адсорбента (на пластинках размером 20×20 см, покрытых слоем в 750 мкм, можно разделять образцы до 50 мг).

Документация хроматограмм

Наиболее распространенными способами документации хроматограмм являются зарисовка (копирование) на кальке и фотокопирование (черно-белое и цветное).

Для документации хроматограмм Институтом физиологии растений АН СССР предложено использовать аппарат для контактной печати на фотографическую бумагу с окрашенных пластинок [33, 152]. Предложенный способ обеспечивает получение изображений всех тех пятен, которые можно различить визуально, а также позволяет сохранить первоначальный вид тонкослойной пластинки и ее пригодность для дальнейшей работы.

Хранение готовых тонкослойных хроматограмм нецелесообразно, однако в случае необходимости оригинальную хроматограмму можно сохранить, сняв слой сорбента с пластинки в виде пленки, которую получают после заливки его 4%-ным раствором коллодия с добавкой 7,5% глицерина [36, 205]. Для хранения эту пленку наклеивают на лист бумаги с помощью прозрачной пластмассовой ленты.

3.4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА ЛИПИДОВ

С помощью адсорбционной хроматографии в тонком слое можно получить общее представление о составе исследуемой смеси липидов любых пищевых продуктов.

Методом ТСХ смесь липидов, экстрагированную из продукта, можно очень быстро разделить на основные группы соединений: фосфатиды, моно- и диглицериды, стерины, свободные жирные кислоты, триглицериды, углеводороды и некоторые другие [15, 114, 205].

Выделенные из продукта липиды (например, экстракцией по методу Фолча, в ФДВ) чаще всего подвергают разделению на пластинке с закрепленным слоем силикагеля различных марок. Пробы липидов по 1—5 мг (на пластинки размером 13×18 см) для качественного и по 100—200 мг (на пластинки размером 18×24 см) для количественного анализа обычно наносят микропипеткой в виде полосы на расстоянии 2 см от нижнего края пластинки и не менее 2 см между пятнами. Разделение проводят восходящим способом в камере, насыщенной соответствующими растворителями (табл. 8).

При качественном определении липидов после подъема фронта растворителя до верхнего края пластинки ее вынимают и ос-

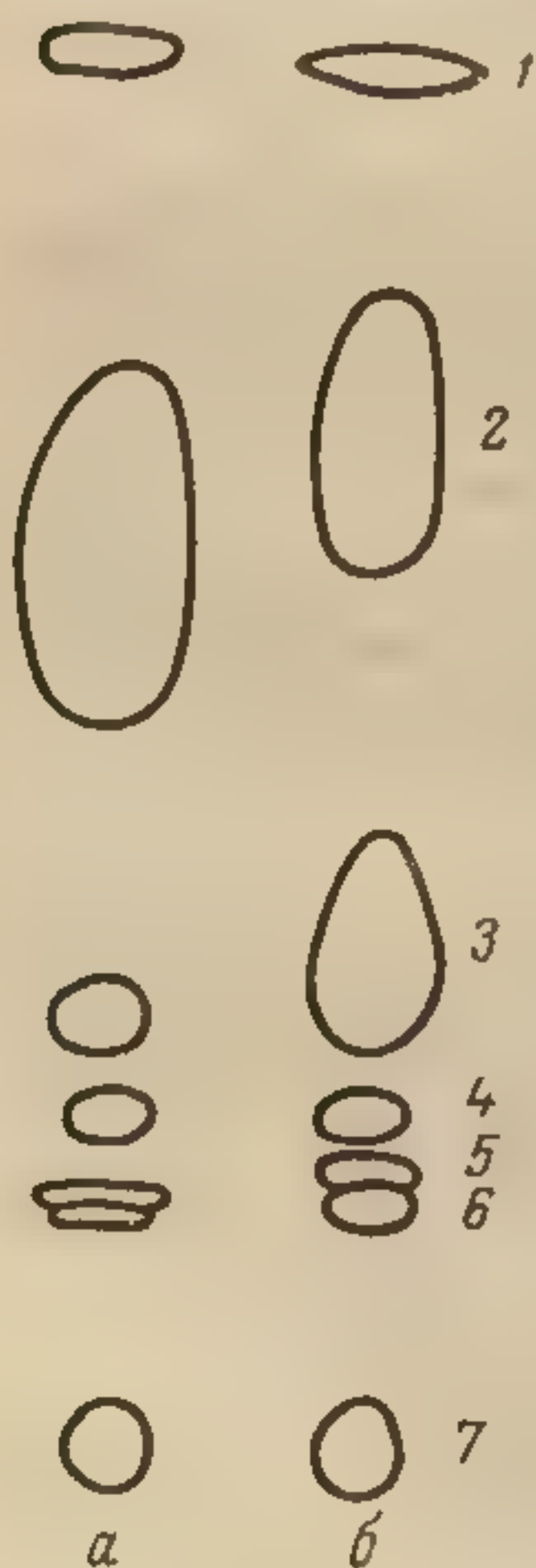


Рис. 17. Хроматограмма липидов щуки, замороженной при -15°C :

а — не хранившейся; б — хранившейся 3 месяца; 1 — углеводороды; 2 — триглицериды; 3 — свободные жирные кислоты; 4 — диглицериды; 5 — холестерин; 6 — моноглицериды; 7 — полярные липиды (фосфолипиды)

Таблица 8

Фракционирование липидов на закрепленном слое силикагеля

Название продуктов	Марки силикагеля	Система растворителей	Соотношение по объему	Источник литературы
Сливочное масло . .	КСК	Гексан-этиловый эфир-ледяная уксусная кислота	80:20:1	[166]
Подсолнечное масло	КСК	Петролейный эфир-этиловый эфир-ледяная уксусная кислота	85:15:1	[215]
Фритюрный жир . .	КСК	Бензол-петролейный эфир-этиловый эфир	80:80:5	[212]
Мясо	КСК	Петролейный эфир-этиловый эфир	80:20	[219]
		Петролейный эфир-этиловый эфир-ледяная уксусная кислота	80:20:1	[219]
Рыба	Woelm, Merck	То же	80:20:1	[5, 7]
Икра осетровых . .	КСК	»	90:10:1	[161]
Молоко	Силуфольные пластины, Merck, LS 5/40	»	80:20:1	[124, 5]
Зерно и продукты его переработки	Merck, Woelm	»	80:20:1 80:20:2	[5] [4]

тавляют под тягой до полного исчезновения запаха растворителя. Затем пластинки проявляют 10%-ным спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты с последующим нагреванием при 110° С, в результате чего образуются синие пятна разделенных липидов на желтом фоне.

При количественном исследовании липидов пластинки погружают в камеру, насыщенную парами йода. Проявившиеся полосы липидов (каждую отдельно) соскребают с последующей элюацией смесью хлороформа и метанола (4:1). Растворитель удаляют на роторном испарителе. Количество разделенных классов липидов находят весовым методом. Количественные определения также можно выполнить с помощью денситометров.

Поскольку разделение классов липидов осуществляют в тонком слое силикагеля различных марок с использованием разных систем растворителей, то получающиеся хроматограммы могут несколько отличаться друг от друга. Поэтому в каждом отдельном случае к идентификации липидов пищевых продуктов следует подходить индивидуально. Различные классы соединений

липидов идентифицируют: с помощью «свидетелей», по известным величинам R_f , по ИК-спектрам соединений, выделенных из отдельных пятен хроматограмм.

Высокая четкость разделения в тонком слое сорбента позволяет определить многие группы веществ, которые не могут быть обнаружены другими методами. При этом каждая из групп соединений может быть не только определена количественно, но и выделена препаративно и подвергнута дальнейшему исследованию.

На рис. 17 показано изменение липидов замороженной щуки при хранении [7], изученное с помощью метода ТСХ.

3.4.3. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ

Для разделения и количественного определения фосфолипидов наиболее простым, быстрым и чувствительным методом также является хроматография в тонких слоях силикагеля.

Разделение фосфолипидов осуществляется на силикагеле разных марок с использованием различных систем растворителей как одномерной, так и двухмерной хроматографии. Для одномерной хроматографии фосфолипидов продуктов растительного и животного происхождения рекомендованы такие системы растворителей: хлороформ-метанол-вода в соотношении 65:25:4 [130], или 45:25:4 [8], либо 3:1:0,2 [176], а также хлороформ-метанол-аммиак в соотношении 65:25:5 [152].

Хорошие результаты по разделению фосфолипидов животных тканей получены двухмерной хроматографией в следующих системах растворителей: хлороформ-метанол-вода в соотношении 65:25:4 (направление 1) и хлороформ-метанол-25%-ный аммиак в соотношении 14:6:1 (направление 2) — [71] или хлороформ-метанол-ледяная уксусная кислота-вода в соотношении 45:30:6:3 (направление 1) и хлороформ-метанол-вода в соотношении 65:24:4 (направление 2) — [210].

В литературе имеется более подробный список систем растворителей для разделения фосфолипидов на закрепленном силикагеле и реактивов их идентификации [152].

Идентификацию фосфолипидных фракций на характерные для определенных фосфолипидов функциональные группы [152, 210] проводят с помощью цветных реактивов.

В качестве универсального проявителя фосфолипидов служит раствор молибденовокислого аммония в смеси с соляной и хлорной кислотами — 3 г $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, 25 мл воды, 30 мл 1н. HCl и 15 мл 60%-ной HClO_4 . После опрыскивания пластинок и выдерживания при 105°С в течение 20 мин появляются темные пятна на слабо-сером фоне. Пары йода окрашивают ненасыщенные фосфолипиды в коричневый цвет на белом фоне.

Фосфолипиды, содержащие свободные аминогруппы (фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин), проявляют 0,2%-ным

раствором нингидрина в н-бутаноле с 5 мл 10%-ной уксусной кислоты и нагревают 30 мин при 110°С (наблюдают красно-фиолетовые или розовые пятна на белом фоне). Холинсодержащие фосфолипиды (лецитин, лизолецитин, сфингомиелин) обнаруживают с помощью реактива Драгендорфа. Этот реактив представляет свежеприготовленную смесь двух растворов: 1) основной нитрат висмута (1,7%-ный раствор на 20%-ном растворе уксусной кислоты); 2) 40%-ный водный KI. Для опрыскивания смешивают 20 мл раствора 1 с 5 мл раствора 2 и добавляют 70 мл воды. Наблюдают оранжевые или красно-оранжевые пятна сразу или после незначительного нагревания.

Все эти реакции можно проводить последовательно на одной и той же хроматограмме, только наложение одного реактива на другой дает грязный фон. Поэтому лучше провести последовательную обработку хроматограммы разными красителями, загоразживая непроявленные полосы стеклом.

Имеются красители, которые дают возможность выявить фосфолипиды в ультрафиолетовом свете. К ним относятся родамин-В и 6G, 2,7-дихлорфлуоресцеин и морин. При обработке хроматограммы 0,05%-ным раствором родамина-В пластинка равномерно окрашивается в розовый цвет, а под ультрафиолетом появляются флуоресцирующие пятна фосфолипидов на розовом фоне, которые обводят препаровальной иглой. После опрыскивания хроматограмм 0,2%-ным раствором 2,7-дихлорфлуоресцеина в 96%-ном этаноле под ультрафиолетовой лампой на зеленоватом фоне появляются фиолетовые флуоресцирующие пятна. Пятна необходимо отмечать сразу же после опрыскивания, так как при испарении спирта флуоресценция исчезает, но появляется вновь при повторном опрыскивании 2,7-дихлорфлуоресцеином. Вместо 2,7-дихлорфлуоресцеина можно использовать 3,6-дихлорфлуоресцеин. Несколько более слабое свечение пятен фосфолипидов дают флуоресцеин и родамин-6G.

Цветные реакции на фосфолипиды не являются строго специфичными, поэтому для получения точной идентификации необходимо применять «свидетели», которые рекомендуется наносить в две точки, находящиеся на краях пластинки, а исследуемый раствор фосфолипидов — в точки, расположенные в ее середине.

Учитывая, что отдельные фосфолипиды трудно получить в чистом виде (в силу их неустойчивости), в качестве «свидетелей» используют лецитин яичного желтка или липидный экстракт с известным составом фосфолипидов, например липиды печени крыс [8]. Для идентификации отдельных фосфолипидов применяют ИК-спектрофотометрию [130].

Количественное содержание фосфолипидных фракций измеряют как с помощью денситометра, так и элюированием пятен для определения содержания в них фосфора, которое в дальнейшем пересчитывается на фосфолипиды.

Для получения устойчивой черной окраски, необходимой для денситометрии пятен, хроматограммы опрыскивают насыщенным раствором $K_2Cr_2O_7$ в 80%-ной серной кислоте и выдерживают в сушильном шкафу при $180^\circ C$ в течение 25 мин. Хороший белый фон при обугливание фосфолипидов достигается при опрыскивании пластинок хромовой смесью без предварительной обработки другими реактивами [152].

Для количественного определения фосфолипидов по содержанию фосфора колориметрическим методом проводят элюирование пятна 1 н. HCl в метаноле. Полноту элюирования фосфолипида проверяют путем нанесения элюата на микропластинки и вторичного проявления универсальным красителем фосфолипидов (родамин-В, хромовая смесь). При обнаружении фосфолипидов силикагель с пятном вновь экстрагируют 1 н. HCl в метаноле до полного элюирования.

Сущность метода определения фосфора сводится к минерализации полученного липидного экстракта концентрированной H_2SO_4 в присутствии катализаторов и нахождению неорганического фосфора путем восстановления фосфорно-молибдатного комплекса, в результате чего образуется синяя окраска. По степени окрашивания, определяемой колориметрически, вычисляют количество фосфора. Для количественных определений фосфолипидных фракций можно рекомендовать колориметрический метод в модификации А. В. Жукова и А. Г. Верещагина [74].

3.4.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ

ТСХ находит широкое применение при исследовании витаминов, особенно жирорастворимой группы.

Разделение и идентификация каротиноидов

Для разделения каротиноидов успешно применяют метод ТСХ на окиси магния или окиси алюминия II степени активности толщиной 1 мм. Для получения окиси алюминия II степени активности [15] к обезвоженному сорбенту добавляют 3% воды, смесь встряхивают в банке с хорошо пригнанной пробкой в течение 5—10 мин и оставляют на 6—8 часов.

Определение каротиноидов в плодах и овощах. Метод основан на экстракции каротиноидов органическими растворителями и разделении их методом ТСХ [118, 58, 134, 184].

Навеску продукта (от 2 до 2,5 г в зависимости от содержания каротиноидов) растирают в ступке с обезвоженным сернокислым натрием до получения сухого порошка. Для предотвращения окисляемости витаминов рекомендуется добавить несколько кристалликов углекислого натрия. Для экстракции каротиноидов обычно применяют бензин, петролейный эфир ($70-100^\circ C$) или ацетон. Пробу экстрагируют до полного извлечения

пигментов, для чего обычно достаточно пяти-шести экстракций. Экстракт рекомендуется освободить от взвешенных частиц фильтрованием под вакуумом (можно на воронке Бюхнера), промыть водой (лучше использовать подсоленную воду) и обработать щелочью (что дает возможность в результате омыления освободиться от хлорофилла и других омыляемых пигментов и различных сложных эфиров). Дальнейшую очистку каротиноидов можно провести методом колоночной хроматографии. Очищенный экстракт сгущают под вакуумом до небольшого объема.

Полученный экстракт в количестве от 0,2 до 1 мл наносят на стеклянные пластинки, покрытые окисью магния или окисью алюминия II степени активности, и подвергают разделению в одной из систем подвижных растворителей, которые указаны в табл. 9. Разделение обычно занимает 30—35 мин. Большинство каротиноидов окрашено и легко обнаруживается при дневном свете в виде ярко окрашенных и резко очерченных зон. Каждую зону выделяют и элюируют петролейным эфиром. Для лучшего элюирования каротиноидов рекомендуется добавить 1—2 капли этилового спирта. Идентификацию каротиноидов проводят по максимумам поглощения в видимой области спектра в интервалах длин волн от 400 до 500 нм, величинам R_f путем сравнения со стандартными растворами «свидетелей», в качестве которых обычно используют α - и β -каротиноиды, выделенные из моркови; ликопин идентифицируют по ИК-спектру.

Содержание каротиноидов определяют спектрофотометрически, используя стандартную кривую по бихромату калия. Для этого 0,072 г дважды перекристаллизованного бихромата калия растворяют в 100 мл воды; 1 мл такого раствора соответствует 0,00416 мг каротина [134].

Определение токоферолов

Разделение токоферолов проводят в закрепленном слое силикагеля в различных системах растворителей (табл. 9). Для обнаружения изомеров токоферола применяют растворы йода, хлорного железа, орто-фенаントрина и др. Для идентификации β - и γ -токоферолов, отличающихся положением гидроксильных групп и обладающих одинаковой подвижностью, хроматограмму проявляют сульфатом церия или 2%-ным содовым раствором и раствором диазотированного о-днанизидина [15]. В качестве «свидетелей» обычно применяют синтетический α -токоферол и соевое масло, содержащее только α -, β - и γ -токоферолы.

Определение изомеров токоферола в растительных маслах. Метод определения токоферолов в растительных маслах основан на выделении неомыляемых веществ и разделении их в тонком слое силикагеля. Рекомендованный способ позволяет не только отделить токоферолы от сопутствующих веществ, но и провести четкое разделение изомеров токоферола [200].

Таблица 9

Определение каротиноидов и токоферолов

Определяемые вещества	Сорбент	Системы растворителей	Соотношение по объему	Источник литературы
Каротиноиды	Окись алюминия II степени активности, окись магния	Ацетон-петролейный эфир Петролейный эфир-бензол-метанол	1:3 или 2:48 60:10:1	[153] [134, 184] [118]
Токоферолы	Силикагель	Хлороформ Хлороформ-циклогексан	2:1	[200] [145, 153] [213]

3 г масла омыляют 10%-ным спиртовым раствором КОН в присутствии пирогаллола, и неомыляемую фракцию экстрагируют диэтиловым эфиром. После отгонки растворителя (в атмосфере инертного газа) полученный остаток неомыляемых веществ растворяют в 5 мл бензола и подвергают разделению на пластинках с закрепленным слоем силикагеля.

Для хроматографирования используют пластинки, которые покрыты слоем силикагеля (марки КСК или АСК), скрепленного 15% гипса, и активированы при 110° С в течение 2 ч. В качестве подвижного растворителя служит хлороформ. Хроматограмма развивается в темноте (обычно за 35—45 мин). Для проявления хроматограммы пластинку опрыскивают реактивом Эммери—Энгеля, состоящего из равных объемов 0,25%-ного спиртового раствора α -, α' -дипиридила и 0,1%-ного спиртового раствора FeCl_3 . Токоферолы окрашиваются этим реактивом в розовый цвет. Положение пятен определяют с помощью стандартного раствора α -токоферола и по величинам R_f .

Для количественного определения токоферолов пластинку делят на две части, на каждую из которых наносят бензольный раствор неомыляемых веществ соевого масла. После развития хроматограммы и подсушивания пластинки левую половину ее закрывают стеклом, а правую опрыскивают реактивом Эммери—Энгеля. С левой части пластинки на высоте окрашенных пятен токоферолов соскребают слой силикагеля, из которого разделенные вещества элюируют с помощью этанола, сорбент удаляют центрифугированием.

Количественные определения отдельных изомерных форм токоферолов проводят колориметрическим методом по калибровочной кривой, составленной по синтетическому α -токоферолу, ацетату, который омыляют и выделяют описанным выше способом. Остаток растворяют в спирте для получения раствора, содержащего 1 г/л α -токоферола, из которого затем путем соответствующих разведений готовят растворы с содержанием α -то-

коферола от 0,005 до 0,05 г/л для проведения колориметрической реакции. К 4 мл элюата добавляют 0,5 мл 0,25%-ного спиртового раствора α -, α' -дипиридила и 0,5 мл 0,1%-ного спиртового раствора FeCl_3 . Через 5 мин измеряют оптическую плотность окрашенного раствора при длине волны 520 нм против контрольного раствора, состоящего из 4 мл этанола, 0,5 мл раствора α -, α' -дипиридила и 0,5 мл раствора FeCl_3 .

Содержание токоферолов (в процентах веса пробы) рассчитывают с помощью калибровочного графика в пересчете на α -токоферол по формуле

$$X = \frac{S \cdot A}{V \cdot P}, \quad (36)$$

где S — объем бензольного раствора неомыляемых веществ, мл;

A — найденное по калибровочному графику содержание токоферолов, мг;

V — объем нанесенного на пластинку бензольного раствора неомыляемых веществ, мл;

P — навеска масла, г.

3.4.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ

Метод ТСХ для определения остаточных количеств пестицидов в пищевых продуктах считается перспективным с точки зрения экспрессности и избирательности. Им широко пользуются для контроля за остаточным содержанием пестицидов в плодоовощном сырье и консервной продукции [93, 110, 192]. В табл. 10 приведены условия разделения и величины R_f для некоторых пестицидов, обнаруживаемых в пищевых продуктах.

Определение хлорофоса в овощах, фруктах, зерне, молоке, мясе

Метод основан на экстракции ядохимиката из исследуемой пробы водой с последующим извлечением его из водного раствора хлороформом, очистке экстракта и определении в тонком слое силикагеля [93].

Экстракция препарата. 25 г измельченной пробы (овощи, фрукты, зерно, мясо) трижды экстрагируют водой порциями по 70 мл и дважды по 50 мл на аппарате для встряхивания в течение 15 мин. Водные экстракты соединяют, прибавляют 1—1,5 г хлористого натрия (чтобы избежать образования эмульсии при дальнейшей экстракции) и хлорофос трижды экстрагируют хлороформом, насыщенным водой, порциями по 50 мл. Хлороформные экстракты объединяют, сливают через слой безводного сернокислого натрия и сушат в течение 10—15 мин.

В случае анализа мяса при встряхивании в делительной воронке в нижнем хлороформном слое образуется стойкая эмуль-

Таблица 10

Условия разделения и величина R_f для некоторых пестицидов, содержащихся в пищевых продуктах
[93, 110]

Разделяемые пестициды	Подвижная фаза	Проявляющий реактив	Условия проявления	Цвет пятна после проявления	Значение R_f				
					на силикагеле МР-1				в тонкослойной хроматографии
					КСС-3	ШСК	КСК-2	КСК-3	
Метафос Тнофос Метилнитрофос и-нитрофенил	Гексан-ацетон (4:1)	4н. раствор едкого натра	20 мин. 120—130° С	Желтый					0,5—0,6 0,5—0,6 0,5—0,6 0,1—0,2
Фенкаптол	Четыреххлористый углерод	0,05 г бромфенолового синего растворяют в 10 мл ацетона и доводят до 100 мл 0,5%-ным раствором азотно-кислого серебра в водном растворе ацетона (1:3)	10 мин. 35—40° С	Синий	0,42	—	—		
	Хлороформ				0,85	0,95	0,98		
Фталафос Цидеал Карбофос Фозалон	Хлороформ	0,05 г бромфенолового синего растворяют в 10 мл ацетона и доводят до 100 мл 0,5%-ным раствором азотно-кислого серебра в водном растворе ацетона (1:3)	10 мин. 35—40° С	Синий	0,36 0,8 0,59 0,72	0,56 0,81 — 0,77	0,47 — — 0,77		

Хлорофос	Гексан-ацетон	2%-ный раствор резорцина с 10%-ным раствором карбоната натрия (2:3)	10 мин. 100° С	Оранжевый	0,31	0,4			
Линдан Альдрин ДДД Гептахлор	н-гексан	0,5 г азотнокислого серебра в 5 мл воды, прибавляют 10 мл аммиака и доводят ацетоном объем раствора до 100 мл	УФ-свет	Серо-черный				0,19 0,68 0,40 0,65	0,34 0,83 0,30 0,76
Севин	Бензол-ацетон (9:1) Хлороформ Гексан-метанол (1:7,5)	1,25%-ный раствор диазотированной сульфаниловой кислоты в 25%-ном растворе едкого натра		Красный				0,5	0,7—0,8 0,49—0,72 0,1—0,8
Прометрин	Гексан-ацетон (4:1)	0,4%-ный ацетоновый раствор бромфенолового синего и 2%-ный водный раствор азотнокислого серебра (1:1); после нагревания и охлаждения пластину опрыскивают 2%-ным водным раствором лимонной кислоты	20 мин. 50° С	Синий					0,1
Акрекс Каратан	Гексан-ацетон (4:1)	Нингидриновый реактив (10 мл 0,25%-ного раствора нингидрина смешивают с 1 мл концентрированной уксусной кислоты)	5—6 мин. 100° С 7—8 мин. 100° С	Малиновый Сиреневый				0,48 0,49	

Таблица 10

Условия разделения и величина R_f для некоторых пестицидов, содержащихся в пищевых продуктах
[93, 110]

Разделяемые пестициды	Подвижная фаза	Проявляющий реактив	Условия проявления	Цвет пятна после проявления	Значение R_f				
					на силикагеле марки				на окиси алюминия
					КСС-3	ШСК	КСК-2	КСК-3	
Метафос Тнофос Метилнитрофос п-нитрофенил	Гексан-ацетон (4:1)	4н. раствор едкого натра	20 мин, 120—130° С	Желтый					0,5—0,6
									0,5—0,6
									0,5—0,6
									0,1—0,2
Фенкаптон	Четыреххлористый углерод	0,05 г бромфенолового синего растворяют в 10 мл ацетона и доводят до 100 мл 0,5%-ным раствором азотно-кислого серебра в водном растворе ацетона (1:3)	10 мин, 35—40° С	Синий	0,42	—	—		
	Хлороформ				0,85	0,95	0,98		
Фталафос Цидеал Карбофос Фозалон	Хлороформ	0,05 г бромфенолового синего растворяют в 10 мл ацетона и доводят до 100 мл 0,5%-ным раствором азотно-кислого серебра в водном растворе ацетона (1:3)	10 мин, 35—40° С	Синий	0,36	0,56	0,47		
					0,8	0,81	—		
					0,59	—	—		
					0,72	0,77	0,77		

Хлорофос

Гексан-ацетон

2%-ный раствор резорцина
с 10%-ным раствором карбоната натрия (2:3)

10 мин, 100° С

Оранжевый

0,31

0,4

Цидеал Карбофос Фозалон	Хлороформ	Фенолового синего растворяют в 10 мл ацетона и доводят до 100 мл 0,5%-ным раствором азотно-кислого серебра в водном растворе ацетона (1:3)	10 мин. 35—40° С	Синий	0,36 0,8 0,59 0,72	0,56 0,81 0,5 0,7	0,47
-------------------------------	-----------	--	------------------	-------	-----------------------------	----------------------------	------

Хлорофос	Гексан-ацетон	2%-ный раствор резорцина с 10%-ным раствором карбоната натрия (2:3)	10 мин. 100° С	Оранжевый	0,31	0,4	
Линдан Альдрин ДДД Гептахлор	н-гексан	0,5 г азотнокислого серебра в 5 мл воды, прибавляют 10 мл аммиака и доводят ацетоном объем раствора до 100 мл	УФ-свет	Серо-черный		0,19 0,68 0,40 0,65	0,34 0,83 0,30 0,76
Севин	Бензол-ацетон (9:1) Хлороформ Гексан-метанол (1:7,5)	1,25%-ный раствор диазотированной сульфаниловой кислоты в 25%-ном растворе едкого натра		Красный		0,5	0,7—0,8 0,49—0,52 0,7—0,8
Прометрин	Гексан-ацетон (4:1)	0,4%-ный ацетоновый раствор бромфенолового синего и 2%-ный водный раствор азотнокислого серебра (1:1); после нагревания и охлаждения пластину опрыскивают 2%-ным водным раствором лимонной кислоты	20 мин. 50° С	Синий			0,5
Акрекс Каратан	Гексан-ацетон (4:1)	Нингидриновый реактив (10 мл 0,25%-ного раствора нингидрина смешивают с 1 мл концентрированной уксусной кислоты)	5—6 мин. 100° С 7—8 мин. 100° С	Малиновый Сиреневый		0,48 0,49	

сия, поэтому экстракт сливают вместе с эмульсией, а для ее разрушения в него постепенно добавляют при непрерывном помешивании безводный сернокислый натрий. Пробе дают постоять 10—15 мин, а затем сливают хлороформ через слой безводного сернокислого натрия в сухую колбу. Колбу с оставшимся сернокислым натрием промывают четыре раза хлороформом по 15 мл и присоединяют к экстракту.

При определении хлорофоса в молоке его предварительно обезжиривают центрифугированием в течение 10 мин при 6000 об/мин и фильтруют через вату. Затем к 25 мл добавляют для створаживания 1,1 г фосфорно-молибденовой кислоты и оставляют на 30 мин, периодически встряхивая. После створаживания молоко переносят в центрифужную пробирку, смывая колбу дистиллированной водой два-три раза (не более 20 мл) и центрифугируют 10 мин при 6000 об/мин. Верхний слой сливают через вату в делительную воронку, а к остатку в центрифужной пробирке прибавляют 25 мл дистиллированной воды, разбивают осадок палочкой, тщательно перемешивают и центрифугируют вторично при тех же условиях. Затем объединяют водные экстракты и прибавляют 1 г хлористого натрия. Из полученного раствора препарат трижды извлекают хлороформом, насыщенным водой, порциями по 40 мл. Хлороформные экстракты сливают через слой безводного сернокислого натрия. Если экстракт мутный, то его дополнительно сушат безводным сернокислым натрием.

Отгонка растворителя. Из обезвоженного хлороформного экстракта отгоняют растворитель досуха (под вакуумом при температуре не выше 40°С) и растворяют сухой остаток в точно отмеренном количестве (1 мл) хлороформа или этилового эфира.

Хроматографирование в тонком слое силикагеля. На пластинку с сорбентом наносят 0,1 мл указанного раствора, а если хлорофоса в пробе содержится очень мало, то весь раствор. В качестве сорбента применяют силикагель КСК-3 или ШСК (Воскресенского химкомбината) с размером частиц 40—60 мкм, закрепителем служит крахмал.

На эту же пластинку по обе стороны от пятна пробы наносят «свидетели» — стандартные растворы разных концентраций чистого ядохимиката. Для дополнительной очистки пластинки с нанесенными пробами и «свидетелями» предварительно опускают в чистый бензол. После того как фронт растворителя поднимется на 10 см, пластинку вынимают из камеры и оставляют на несколько минут для испарения растворителя на воздухе. Затем пластинку вновь помещают в камеру, заполненную подвижным растворителем (гексан с ацетоном в соотношении 1:1), и хроматографируют, как указано выше. Высушенную пластинку проявляют 2%-ным водным раствором резорцина с 10%-ным раствором карбоната натрия, которые смешивают перед опрыскиванием в соотношении 2:3, с последующим нагреванием при

100°С в
жевого
Колл
мера и
дартны
зуально

3.4.6. ОП
КИ

Для ра
целлюл
образно
маги в
мендова
стр. 116
целлюл
вителей
хромат
анализа

Опреде
в плодах

Метод
карбон
органи
ЭДЭ-10
ком с
[178].

Под
кипятя
душны
навеск
с квар
перено
том до
ракта.
отгонк
стве 20
Вес
70°С
этилов
других
в 96%
20, 25
держа
нольни

100°С в течение 7—10 мин. Хлорофос проявляется в виде оранжевого пятна.

Количественное определение проводят путем сравнения размера и интенсивности окраски пятен испытуемой пробы и стандартных растворов «свидетелей». Сравнение проводят либо визуально, либо путем измерения их площадей.

3.4.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИ- И ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Для разделения гидрофильных веществ используют тонкие слои целлюлозы. Эффективного разделения добиваются на порошкообразной целлюлозе, полученной из хроматографической бумаги в лабораторных условиях. Способ ее приготовления, рекомендованный Г. Б. Самородовой-Бианки [178], приводится на стр. 116, 120. Для хроматографирования веществ в тонком слое целлюлозы можно использовать системы растворителей и проявителей, аналогичные системам при работе методом бумажной хроматографии, но в случае применения ТСХ сокращается время анализа при высокой четкости разделения.

Определение ди- и трикарбонových кислот в плодах и овощах

Метод количественного и качественного определения ди- и трикарбонových кислот в плодах и овощах основан на экстракции органических кислот, очистке их на катионите КУ-1 и анионите ЭДЭ-10п по методу М. В. Фатеевой [202] и разделении в тонком слое целлюлозы по методу Г. Б. Самородовой-Бианки [178].

Подготовка материала. Навеску 5—20 г плодов или овощей кипятят с 50—80 мл 96%-ного спирта в колбе с обратным воздушным холодильником в течение 7—10 мин. Зафиксированную навеску переносят в фарфоровую ступку и тонко растирают с кварцевым песком в присутствии спирта. Растертую навеску переносят на воронку Бюхнера и экстрагируют 80%-ным спиртом до полного обесцвечивания остатка и стекающего экстракта. В экстракт для предотвращения окисления веществ при отгонке необходимо добавить метабисульфит калия в количестве 200 мл на 30 мл экстракта [77].

Весь спиртовой экстракт отгоняют под вакуумом при 60—70°С почти досуха. Остаток обрабатывают малыми порциями этилового эфира (для удаления хлорофилла, каротиноидов и других эфирорастворимых веществ) и затем растворяют в 96%-ном этиловом спирте, доводя до определенного объема — 20, 25 или 50 мл. В полученной вытяжке можно определить содержание органических кислот, сахаров, аминокислот и фенольных соединений.

Очистка органических кислот. Для лучшего разделения на тонком слое целлюлозы необходимо очистить органические кислоты от сопутствующих веществ (особенно сахаров) с помощью ионообменных смол. Для этого часть спиртовой вытяжки растворяют в воде и пропускают через колонку, заполненную смолой КУ-1. Оптимальная скорость протекающего раствора 1,5—2,5 мл/мин. После того как через колонку пропущен весь экстракт, ее трижды промывают водой порциями по 75 мл. Затем экстракт и промывные воды объединяют, измеряют их объем и берут 25—50 мл для определения общей кислотности путем титрования 0,02 н. едкого натра. Поскольку в элюате содержатся и сахара, его пропускают через анионит ЭДЭ-10п, который связывает кислоты, а сахара переходят в фильтрат. После пропускания элюата через анионит колонку со смолой промывают тремя порциями дистиллированной воды по 75 мл. Фильтрат и промывные воды отбрасывают.

Для вытеснения из анионита органических кислот через колонку пропускают 100 мл 0,1 н. едкого натра, затем колонку промывают дистиллированной водой три раза по 75 мл. Кислоты в виде солей едкого натра переходят в элюат. Чтобы получить их в свободном виде, весь элюат и промывные воды пропускают через колонку с катионитом КУ-1 для удаления катионов Na^+ , промывают колонку тремя порциями воды по 75 мл, фильтрат и промывные воды упаривают на водяной бане досуха и осадок растворяют в 5—10 мл воды или 60 %-ного спирта. Полученную вытяжку используют для разделения ди- и трикарбоновых кислот.

Хроматография органических кислот в тонком слое целлюлозы. На стеклянные пластинки с тонким (200 мкм) слоем целлюлозы наносят вытяжку непрерывной полосой в виде серии пятен. Разделение осуществляют в системе растворителей: этилацетат-уксусная кислота-вода (3:1:1) — [178] или в верхнем слое смеси, состоящей из серного эфира, воды и муравьиной кислоты (18:9:5) — [138]. Время разделения 60 мин при температуре 12—14°C (но не выше 18°C). Пластинки подсушивают в вытяжном шкафу феном и оставляют на воздухе до следующего дня. Для выявления мест расположения органических кислот хроматограмму проявляют 0,05 %-ным раствором бромфенолового синего, при этом на синем фоне появляются желтые пятна органических кислот. Для выяснения качественного состава кислот определяют R_f для каждой кислоты, сопоставляют его с R_f кислоты-«свидетеля».

Для количественного определения органических кислот бромфеноловый синий наносят из микробюретки мелкими каплями в виде пунктирных линий по краям и в середине пластинки (перпендикулярно стартовой линии). Начиная от места расположения кислот пунктир становится желтым, а в промежутках между ними остается голубым. Если муравьиная кис-

лота полностью не удалена, то пунктир на всем протяжении будет желтым, и в этом случае сушку следует продолжить.

Места расположения кислот очерчивают, счищают скальпелем, переносят и экстрагируют два-три раза горячей водой при температуре 60°С. Полученные вытяжки кислот титруют 0,02 н. раствором едкого натра из микробюретки в присутствии фенолфталеина, защищая раствор от углекислоты воздуха.

Расчет содержания ди- и трикарбоновых кислот проводят по методу, принятому в бумажной хроматографии [138].

3.4.7. РАЗДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

Метод ТСХ позволяет довольно быстро разделять и определять сахара даже при их небольшом содержании в продукте, а разделенные пятна имеют интенсивную окраску и четко очерченные границы. Известны методы разделения углеводов на целлюлозе [182] и силикагеле [106].

Достаточно удовлетворительное разделение сахаров (сахароза, глюкоза, фруктоза, рафиноза) из растительных объектов [106] проведено на силикагеле марки КСК с использованием в качестве буфера 0,03 молярного раствора ацетата натрия и двух систем растворителей, которые указаны в табл. 11.

Условия приготовления пластинок следующие. 3 г размолотого силикагеля и 0,25 г медицинского гипса, просеянного через сито диаметром 0,05 мм, помещают в маленькую фарфоровую ступку, приливают 12,5—13 мл воды, 0,025—0,03 мл молярного раствора ацетата натрия, пестиком быстро и тщательно перемешивают содержимое и выливают на пластинку (20 × 16 см), равномерно распределяя суспензию по всей поверхности. Для полноты высушивания пластинки оставляют примерно на 12 ч при комнатной температуре, после чего они готовы для анализа.

Для разделения сахаров используют ступенчатую восходящую хроматографию. В первой системе растворителей (см. табл. 11) удастся разделить сахара на три-, ди- и моносахара. После подъема фронта растворителей на 9 см от линии старта пластинку подсушивают в сушильном шкафу при 50°С или феном и переносят во вторую систему растворителей, которая разделяет моносахара — глюкозу и фруктозу. Фронт системы растворителей должен находиться на расстоянии не менее 15 см. Затем пластинку подсушивают в сушильном шкафу при 120°С в течение 20—30 мин. Горячую пластинку опрыскивают α-нафтолом, растворенным в концентрированной серной кислоте (100 мг α-нафтола и 15 мл H₂SO₄). Сахара проявляются в виде темно-синих пятен.

Разделенные сахара на пластинке располагаются от стартового пятна в следующей последовательности: рафиноза, мелибиоза, мальтоза, сахароза, глюкоза, фруктоза, ксилоза.

Сорбенты и системы растворителей для разделения аминокислот и углеводов

Таблица 11

Разделяемые вещества	Сорбент	Система растворителей	Соотношение по объему	Источник литературы
Аминокислоты	Целлюлоза	н-бутанол-ацетон-аммиак-вода (I)	20:20:10:4	[178]
		Изопропанол-муравьиная кислота-вода (II)	20:1:5	[178]
		Изопропанол-муравьиная кислота-вода	20:1:5	[178]
	Силикагель	96%-ный этанол-вода	70:30	[205, 15]
		н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода	60:20:20	[205, 15]
		Фенол-вода	75:25	[15]
Углеводы	Целлюлоза	Вторичный бутанол-этилацетат-вода	8:12:3	[182]
		н-бутанол-пиридин-вода	10:3:3	[182, 15]
		н-бутанол-25%-ный аммиак-вода	16:1:2	[182, 15]
	Силикагель	Изопропанол-этилацетат-вода (I)	45:65:20	[106]
		н-пропанол-этилацетат-вода (II)	40:60:5	

Эффективно разделение сахаров в закрепленном слое бумажной целлюлозы толщиной 0,1—0,2 мм, смешанной с гипсом и водой и нанесенной на стеклянные пластинки размером 13×18 см (после нанесения пасты пластинки высушивают в течение 5—15 ч на воздухе и 40 мин при 104—106°С). Наиболее подходящие системы растворителей для разделения сахаров в тонком слое целлюлозы указаны в табл. 11. За 5—10 ч при 20—22°С в восходящем потоке обычно происходит четкое разделение смеси сахаров [182].

3.4.8. РАЗДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Разделение аминокислот можно осуществить в тонком слое целлюлозы или силикагеля как двухмерной, так и одномерной хроматографией с использованием различных систем растворителей (см. табл. 11).

Для разделения в двух направлениях на целлюлозе сначала используют смесь н-бутанол-ацетон-аммиак-вода (20:20:10:4), а после высушивания в течение 2 ч горячим феном проводят разделение в другом направлении в кислом растворителе: изопропанол-муравьиная кислота-вода (20:1:5). Хроматограмму высушивают и сразу проявляют 0,4%-ным раствором нингидрина в ацетоне [178].

Для разделения свободных аминокислот в растительных продуктах обычно применяют одномерную хроматографию [15, 178, 205].

3.5. КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

3.5.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Колонка, в которой проводят хроматографическое разделение веществ, может быть цилиндрической либо конической формы или специальной конструкции, обычно из стекла, реже из нержавеющей стали, алюминия. Высота колонки от нескольких сантиметров до 5—20 м, диаметр от нескольких миллиметров до 5—15 см. При всем многообразии форм колонок, применяемых в хроматографии, вполне удовлетворительного разделения можно достичь при использовании самых простейших колонок, которые состоят из стеклянной трубки с краном на ее конце типа бюретки для титрования, укрепленной на штативе.

Работа колонки может осуществляться либо под давлением, (обычно для гель-хроматографии), либо под вакуумом (для ионообменной хроматографии). Необходимым условием хроматографического разделения в колонке является равномерная подача в нее как анализируемой смеси, так и жидкости, применяемой в качестве проявителя или вытеснителя. Это условие может быть достигнуто периодическим подливанием жидкости в верхнюю часть колонки с помощью сосуда Мариотта или специальных микронасосов [3, 158]. Обычная скорость потока в зависимости от диаметра колонок 0,5—3 мл/мин. Контроль за величиной скорости потока на протяжении всего опыта осуществляют с помощью реометров и ротаметров [3, 158].

На рис. 18 изображена простая установка для ЖХ. Это стеклянная колонка, в верхней части которой посредством шлифа присоединена капельная воронка для растворителя. Нижний конец колонки оттянут в капилляр (для уменьшения свободного объема колонки и снижения размывания зон разделяемых компонентов у выхода из колонки) и снабжен краном для регулирования скорости потока растворителя. Перед краном впаяна пористая перегородка. Колонка вмонтирована в термостатируемую стеклянную рубашку. Заполняют колонку сорбентом чаще в виде суспензии в том же растворителе, который затем предполагается использовать для разделения. Приготовленную суспензию выливают в колонку, сопровождая заполнение легким постукиванием. При этом кран открыт, и растворитель проходит через колонку, а сорбент задерживается фильтром. Над слоем сорбента в колонке должен находиться слой жидкости. После заполнения колонки присоединяют капельную воронку и краном устанавливают определенную скорость протекания растворителя через колонку.

Пробу вводят микропипеткой или микрошприцем, для чего отсоединяют капельную воронку, но край воронки не закрывают, чтобы не прекратить потока жидкости. Смесь разделяемых веществ сливают в колонку в тот момент, когда слой растворителя над сорбентом опустится до верхней его границы. Затем сверху осторожно наливают растворитель до высоты 1—2 см над поверхностью сорбента и поддерживают этот уровень

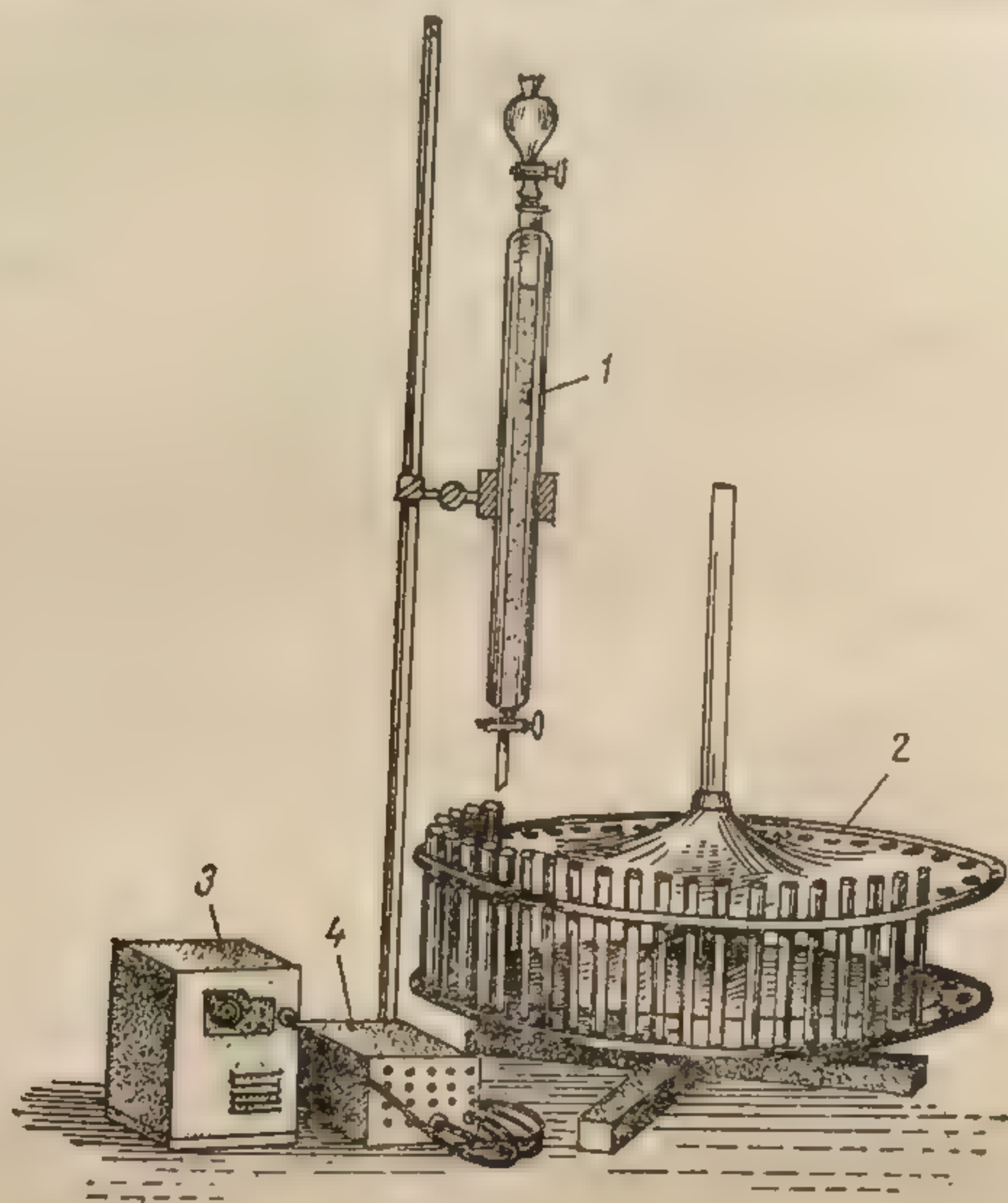


Рис. 18. Колонка для хроматографии и автоматический собиратель фракций:

1 — колонка; 2 — вращающийся коллектор; 3 — микронасос; 4 — шкаф для управления

с помощью капельной воронки на шлифе во время разделения. Разделение начинается с момента подачи растворителя. Стекающий из колонки растворитель собирают малыми порциями через определенные промежутки времени с помощью специальных автоматических коллекторов-сборников фракций, например типа СФ-22. Содержимое каждой пробирки подвергают анализу, определяя концентрацию компонентов смеси (чаще всего определяют оптическую плотность раствора), и строят график зависимости концентрации компонента (или оптической плотности) от объема прошедшего через колонку раствора.

Все большее распространение получают непрерывные методы анализа, с помощью которых регистрацию разделенных веществ у выхода из колонки проводят непрерывно на основе из-

мерения электропроводности раствора, коэффициента рефракции, поглощения света в ультрафиолетовой области, ионизации и т. д. [3, 158, 159]. В частности, в ЖХ перспективным считается использование ПИД [21].

В ЖХ разделение зависит от подвижной и неподвижной фаз, т. е. от колонки и растворителя. Чтобы получить требуемое разделение, необходимо правильно выбрать колонку, тип сорбента, размер и геометрию его частиц [158, 159, 162, 190].

Уменьшения времени удерживания вещества на колонке можно достичь за счет увеличения температуры, однако в большинстве случаев более эффективным является изменение состава подвижной фазы. С этой целью в процессе анализа можно увеличивать ступенчато либо непрерывно полярность подвижной фазы или ионную силу. Такой метод, называемый градиентным элюированием, или проявлением, способствует лучшему разделению веществ. Кроме того, его выгодно применять в тех случаях, когда некоторые из большого числа разделенных компонентов сильнее других удерживаются на сорбенте и промывание колонки растворителем постоянного состава приводит как к большой затрате времени, так и к большому разбавлению растворов. К тому же с помощью градиентного проявления можно избежать появления одного и того же вещества в нескольких порциях раствора. В литературе [190] имеются более подробные сведения о способе, аппаратуре и теории градиентного проявления.

В настоящее время в понятие «колоночная хроматография» входит не только цветовская адсорбционная хроматография. Принято различать следующие наиболее распространенные способы разделения смесей на колонках: распределительная (ЖЖХ), адсорбционная (ТЖХ), ионообменная и гель-фильтрационная хроматография.

Колоночный метод хроматографии позволяет широко варьировать неподвижную и подвижную фазы, что делает его поистине универсальным. Хроматография в колонках тесно связана с ТСХ и обладает многими ее преимуществами, так как и в том, и в другом случае используются аналогичные сорбенты и возможно разделение тех же классов соединений. Но колоночная хроматография большинством исследователей признается более перспективным методом из-за возможности автоматизации процесса; именно в колоночном варианте создается высокоскоростная и высокоэффективная ЖХ [21, 162, 159, 190].

3.5.2. РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Основы метода

В распределительной колоночной хроматографии неподвижная фаза представлена жидкостью, связанной с твердым носителем (например, вода, удерживаемая целлюлозой, является

неподвижной фазой). В качестве подвижной фазы используют различные жидкости, не смывающиеся растворителем. Твердыми носителями могут быть силикагель, окись алюминия, кизельгур, целлюлоза. За последнее время разработаны новые, особенно ценные материалы с контролируемой поверхностной пористостью типа зипакс и корасил, которые представляют собой частицы с твердой непроницаемой стеклянной сердцевинкой и очень пористым поверхностным слоем, имеющим контролируемую толщину и размер пор.

По современным представлениям в распределительной хроматографии происходит распределение веществ не между водой и несмываемым в ней растворителем, а между гелем-носителем и подвижным растворителем [21, 76]. Так, смоченная водой целлюлоза представляет собой как бы концентрированный раствор полисахарида, обладающий некоторыми адсорбционными свойствами по отношению к разделяемым веществам. Поэтому считают, что хроматографический процесс протекает не в системе жидкость-жидкость, а в системе гель-жидкость. По этой причине при хроматографии на колонках с целлюлозой возможно использование смешивающихся с водой растворителей, таких, как водные растворы низших спиртов (метанол, этанол, пропанол) и органических кислот (муравьиная, уксусная).

Применение метода

В принципе этим методом на колонке можно разделить те классы веществ, которые могут быть разделены с помощью хроматографии на бумаге, т. е. и гидрофильные соединения (аминокислоты, сахара), и липофильные вещества (жирные кислоты, алкалоиды).

Обычно для разделения полярных веществ используются полярные неподвижные и полярные подвижные фазы. Примером такого анализа может служить разделение антоцианов на колонке с силикагелем, при котором в качестве неподвижного растворителя используют 10%-ный водный раствор фосфорной кислоты, а в качестве подвижного — смесь н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5) и фенол-толуол (2:1) — [76].

Неполярные вещества разделяются более эффективно при использовании неполярной подвижной и полярной подвижной фаз. Этот метод с «обращенной» фазой применяют для определения суммарного содержания продуктов окисления жиров и фосфатидов, а также рицинолевой кислоты в касторовом масле. При этом в качестве носителя неподвижной фазы используют слабовулканизированные порошкообразные натуральные каучуки или синтетические силиконовые вулканизаты, препарированные 5% перекиси бензоила; неподвижной фазой служит высококипящий бензин, а подвижной — водный раствор ацетона [176].

3.5.3. АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Основы метода

В адсорбционной колоночной хроматографии неподвижная фаза является твердой (окись алюминия, силикагель и др.). В этом случае хроматографическое разделение основано на обусловленном адсорбцией распределении компонентов между подвижной жидкой и неподвижной твердой фазами. В хроматографии в основном используется обратимая молекулярная (физическая) адсорбция, в некоторых случаях возможно слабое обратимое комплексообразование [3, 158].

Тип адсорбента оказывает значительное влияние на разделение веществ. В ЖХ наиболее часто применяются следующие адсорбенты (указаны приблизительно в порядке возрастающей активности): диатомит, силикагель, окись алюминия, окись магния, активированный уголь. В некоторых случаях для молекулярной хроматографии растворов в качестве адсорбентов используют ионообменные смолы, молекулярные сита [3, 126]. Активность адсорбента в значительной степени определяется способом его приготовления, степенью дисперсности.

Наряду с прочно укоренившимися в практике минеральными носителями в колоночной хроматографии наметилась тенденция использования различных органических материалов синтетического происхождения: полнакрилонитрила, полиамидов и др. [126, 76, 230]. Полиамиды (капрон, перлон, нейлон, ультрамид — в разных странах они выпускаются под разными наименованиями) применяют в ЖХ для разделения многочисленных веществ: дубильных, фенолов, органических кислот, амидов, аминов, ДНФ- и динзил-производных аминокислот, сахаров, азотистых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов, витаминов, антиокислителей.

Преимущества колоночной хроматографии на полиамидах заключаются в большой емкости поглощения по сравнению с неорганическими сорбентами типа окиси алюминия или силикагеля, а также в легкости регенерирования концентрированным раствором щелочи. Полиамиды устойчивы к действию большинства органических растворителей, к концентрированным щелочам и разбавленным кислотам, но неустойчивы к окислителям и растворяются в концентрированных минеральных кислотах, феноле, крезоле.

Хроматография на колонках с полиамидами дает возможность применять простые системы растворителей, потому что процессы адсорбции и десорбции подчинены в основном образованию водородных связей. Элюотропный ряд растворителей для полиамидов — вода, этанол, метанол, ацетон, разбавленный NaOH, формамид, диметилформамид [76, 230].

Известны различные марки полиамидов: фирмы Woelm (ФРГ), Serva (ФРГ), KLL (Англия) и др. Порошок полиамида

можно получить из отходов прядильного капронового производства простым и доступным способом в лабораторных условиях [27]. Отходы капронового производства стирают с мылом или стиральным порошком, сушат и обезжиривают кипячением два раза по 15 мин в смеси хлороформа и дихлорэтана (1:1 по объему). Пряжу сушат на воздухе и растворяют в кипящей 80%-ной уксусной кислоте (200 г пряжи на 1 л кислоты). Волокно растворяется мгновенно. Для осаждения капрона вливают тонкой струей воду (около 1,5 л) при энергичном помешивании. При этом образуется однородная густая масса. Кислоту отмывают водой до нейтральной реакции либо на воронке Бюхнера, либо в стеклянной хроматографической трубке (диаметр 5—10 см). Для удаления воды капрон заливают три-четыре раза 96%-ным этиловым спиртом, после чего сушат до слегка влажного состояния при комнатной температуре. Если имеются комочки, то их дробят в ударной мельнице «Универсал» в течение 1—2 сек. Измельченный порошок окончательно высушивают при комнатной температуре и просеивают через сито с диаметром отверстий 1 мм.

Применение метода

Описать все области применения адсорбционной хроматографии не представляется возможным. Применяют адсорбционную колоночную хроматографию для очистки растворителей (гексана, циклогексана и др.), для УФ-спектроскопии и др. Но особенно ценно использование хроматографии в колонках для качественного и препаративного разделения и очистки различных веществ при анализе пищевых продуктов. Этим методом пользуются при определении каротиноидов [138], антоцианов [180], катехинов [179, 194], стероидов [176], витаминов [58], для фракционирования липидов и фосфолипидов на отдельные группы [6, 23].

Определение катехинов и лейкоантоцианов фракционированием на полиамиде

Метод основан на экстракции катехинов и лейкоантоцианов из яблок и последовательном разделении их на мономерные и конденсированные формы на полиамиде 50—70%-ным этиловым спиртом и 0,01 н. раствором КОН в 96%-ном этиловом спирте.

Методика определения. Способ экстракции фенольных соединений описан на стр. 137. Экстракт, выделенный из 20 г мякоти или 10 г кожицы яблок, упаривают под вакуумом и остаток растворяют в 20 мл 96%-ного этилового спирта.

0,3 г полиамида (на 2 г мякоти или на 1 г кожицы) помещают в фарфоровую чашку и добавляют 2 мл вытяжки из мя-

коти (или 1 мл из кожницы). Содержимое фарфоровой чашки разбавляют 10 мл воды и переносят в воронку Шота № 2, которая вставлена в градуированную пробирку с вакуумным отростком.

Сначала из полиамида дважды вымывают сахара и органические кислоты порциями дистиллированной воды по 10 мл. Затем элюируют свободные катехины и лейкоантоцианы 10-кратным вымыванием 50%-ным этиловым спиртом по 2 мл до общего объема 20 мл.

Элюацию конденсированных форм катехинов и лейкоантоцианов проводят при одновременной нейтрализации 0,01 н. раствора КОН в 96%-ном этиловом спирте 0,1 н. раствором соляной кислоты. Для этого в пробирку с отростком добавляют 1 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты и затем конденсированные катехины и лейкоантоцианы вымывают пять раз по 2 мл 0,01 н. раствором КОН в 96%-ном этиловом спирте до общего объема 10 мл.

В первой фракции определяют содержание свободных катехинов с ванилиновым реактивом. Для этого 1 мл элюата смешивают с 5 мл ванилинового реактива (1 г ванилина на 100 мл концентрированной HCl). Интенсивность полученного окрашенного раствора измеряют через 2—3 мин на ФЭК при зеленом светофильтре № 2 в кюветах 0,5 см. Для контроля берут 1 мл элюата и 5 мл концентрированной HCl. Концентрацию свободных катехинов рассчитывают по катехину, как указано в работе Г. Б. Самородовой-Бианки [179].

Во второй фракции определяют сумму конденсированных катехинов и лейкоантоцианов с ванилиновым реактивом. Методика их определения такая же, как и для свободных катехинов. Пересчет делают по калибровочной прямой, построенной по димеру (—)-эпикатехина и лейкоцианидина [179]. Для определения концентрации лейкоантоцианов к 1 мл элюата добавляют 4 мл смеси н-бутилового спирта и соляной кислоты в соотношении 3:1 и выдерживают на кипящей водяной бане (96—98°C) 30 мин. Затем измеряют оптическую плотность при длине волны 536 нм в кюветах толщиной слоя 0,3 см. В качестве контроля берут 1 мл элюата и 4 мл смеси н-бутилового спирта и соляной кислоты (3:1), выдерживают при комнатной температуре в темноте 30 мин, после чего измеряют оптическую плотность.

Содержание лейкоантоцианов рассчитывают по калибровочной прямой [179], построенной по димеру (—)-эпикатехина и лейкоцианидина, обработанного смесью н-бутилового спирта и концентрированной соляной кислоты в соотношении 3:1 в течение 30 мин на кипящей водяной бане.

Разность между суммой конденсированных катехинов и лейкоантоцианов и количеством лейкоантоцианов будет равна сумме конденсированных форм катехинов.

3.5.4. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Основы метода

В ионообменной хроматографии вместо обычной адсорбции происходит адсорбция ионов. Этот метод основан на использовании для разделения смесей электролитов ионитов или ионообменников, способных обменивать свои ионы на ионы электролитов в растворе. Разделение происходит вследствие различной способности разных ионов к такому обмену. Процесс обмена ионов между ионитами и растворами электролитов обуславливается диффузией ионов из раствора к иониту и от ионита в раствор. При этом обмен ионов происходит эквивалентно, т. е. из ионита ионы вытесняются в таком же количестве, в каком поглощаются из раствора.

Этот вид хроматографии позволяет применить весь арсенал химических реакций, недоступный при простой физической сорбции. Так, в колонку могут быть введены вещества, образующие комплексные соединения с поглощенным ионом или меняющие рН среды, а следовательно, и степень диссоциации поглощенного соединения.

Ионообменные материалы представляют собой важный класс неподвижных фаз, используемых в ЖХ [126, 158]. Наиболее часто применяют синтетические ионообменные смолы (обычно сополимеры стирола и дивинилбензола): катиониты (сильно- и слабокислотные) и аниониты (слабо- и сильноосновные). Свойства ионообменников зависят от наличия в них активных групп. Так, наиболее важные сильные катиониты содержат сульфогруппы ($-\text{SO}_3^-\text{H}^+$), а слабокислотные — карбоксильные группы ($-\text{COO}^-\text{H}^+$). Сильноосновные анионообменные смолы обычно имеют четвертичные аммонийные обменные группы $[-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{—CH}_3)_3\text{Cl}^-]$, а слабоосновные — такие функциональные группы, как $[-\text{N}^+\text{H}(\text{R}_2)\text{Cl}^-]$.

Из ионообменников, выпускаемых промышленностью, можно указать зарубежные дауэкс и амберлиты; отечественные смолы — КУ-1, КУ-2, СДВ, КБ-2, КБ-4, АВ-17, АВ-18, АВ-19, АН-23 и др. (табл. 12).

При анализе пищевых продуктов (для очистки и выделения различных веществ) также применяют ионообменники на основе углеводов. Перспективным в ионообменной хроматографии является использование замещенной целлюлозы (в виде хлопьев или порошка) в качестве неподвижных фаз.

Основные хроматографические разделения с применением ионообменных смол проводят в водных растворах или смешанных растворителях, таких, как вода-метанол. Часто используют водные буферные растворы различных концентраций. Разделение и время удерживания регулируют, изменяя рН и ионную силу раствора.

Таблица 12

Характеристика некоторых ионообменных смол, используемых в ЖХ

Тип	Марка	Активные группы	Объемная емкость, мг-экв г
Катиониты: сильнокислотные . . .	КУ-1	$-\text{SO}_3\text{H}$	4,5
	КУ-2	$-\text{SO}_3\text{H}$	4,8
	КУ-6	$-\text{SO}_3\text{H}; -\text{COOH}$	5,5
	НСФ	$-\text{SO}_3\text{H}$	3,0
	СДВ	$-\text{SO}_3\text{H}$	4,2
	Дауэкс-50	$-\text{SO}_3\text{H}$	4,0
	Амберлит 1R 120	$-\text{SO}_3\text{H}$	4,5
	Амберлит 200	$-\text{SO}_3\text{H}$	5,0
	слабокислотные . . .	КБ-4	$-\text{COOH}$ 8,5—9,5
		КН	$-\text{COOH}$ 6,0
		КМ	$-\text{COOH}$ 7,5
		Амберлит 1RC-50	$-\text{COONa}$ 10,0
		Дуолит СС-3	$-\text{COONa}$ 7,0
Аниониты: сильноосновные . . .	АВ-17	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	4,3
	АВ-18	$\text{N}^+ \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle$	3,0
	АВ-19	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	3,0
	Дауэкс-1	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	3,2
	Амберлит 1RA-40	$-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$	3,0
	АН-18	$\equiv\text{N}; =\text{NH}$	3,6
	Дауэкс-3	$-\text{NH}(\text{R}_2)\text{Cl}^-$	5,5
	Амберлит 1-45	$-\text{NH}_2$	6,8
	ЭДЭ-10п	$-\text{NH}_2; =\text{NH}$	8,5—10
	слабоосновные . . .		

Относительная избирательная сорбируемость ионов на том или ином сорбенте зависит от природы разделяемых веществ, растворителя и сорбента, концентрации растворов, величины рН среды и условий проведения опыта. Важными стадиями работы с ионообменниками являются их подготовка к эксперименту и регенерация после обработки [158].

Применение метода

Ионообменная хроматография — это простейший и наиболее эффективный способ разделения веществ, молекулы которых могут диссоциировать в растворе с образованием либо положительно, либо отрицательно заряженного иона. Это особенно важно для решения многих биохимических проблем. Ионообменная хроматография широко используется как метод разделения и выделения веществ, предшествующих их количественному определению. Нередки случаи, когда количественные определения веществ были невыполнимы без их предварительного хроматографического разделения на ионообменных колонках.

Кроме молекулярных и ионообменных сорбентов, применяют синтетические ионообменники с окислительно-восстановительными свойствами [158].

Разделение смеси ионов может быть осуществлено методом осадочной хроматографии, которая основана на образовании труднорастворимых осадков в определенном порядке, обусловленном их растворимостью [158]. Метод осадочной хроматографии используют, например, при определении солей тяжелых металлов в молочных продуктах [82].

Выделение и метилирование жирных кислот

Методика выделения и метилирования на ионообменной смоле свободных жирных кислот, разработанная Н. А. Головкиным и Р. Л. Перкель, представляет модификацию метода Хорштейна [40].

Поглощение свободных жирных кислот из жирового экстракта производится в динамических условиях на колонке с сильноосновным амберлитом ИРА-401 в бикарбонатной форме.

Зарядка

смолы: $-N(R_3)Cl + NaHCO_3 \rightarrow -N(R_3)HCO_3 + NaCl$.

Приготовление ионообменной смолы. 50 г амберлита ИРА-401 выдерживают 10—12 ч в 4 н. растворе HCl в конической колбе емкостью 500 мл, после чего промывают водой до нейтральной реакции и перемешивают с 200 мл 1н. раствора бикарбоната натрия в течение 30—40 мин. Полученную смолу в бикарбонатной форме промывают сначала несколькими порциями дистиллированной воды до нейтральной реакции по универсальному индикатору, затем тремя порциями 96%-ного этанола для замещения воды и тремя порциями смеси эфира и 96%-ного этанола (1:1). Смолу хранят под указанными растворителями в холодильнике при температуре от 0 до $-2^\circ C$.

Подготовка ионообменной колонки. В колонку диаметром 9 мм и высотой 16—20 см наливают 3—5 мл смеси эфира и

этанола (1:1), помещают тампон из стеклянной ваты, затем приливают амберлит в бикарбонатной форме, суспендированный в той же смеси, до получения слоя 15 см и сверху помещают второй тампон из стекловаты.

Поглощение свободных жирных кислот на колонке. К 50 мл раствора жира в четыреххлористом углероде добавляют 2 мл стандартного 1%-ного раствора тридекановой кислоты в том же растворителе (который используют в качестве внутреннего стандарта при последующем количественном ГХ-анализе жирных кислот) и 50 мл 96%-ного этанола. Смесь тщательно перемешивают и пропускают через колонку со скоростью около 1 мл/мин для поглощения свободных жирных кислот: $\text{—N(R)}_3\text{HCO}_3 + \text{RCOOH} \rightarrow \text{—N(R)}_3\text{OCOR} + \text{H}_2\text{CO}_3$. Смолу промывают от жира вначале 30 мл смеси четыреххлористого углерода и абсолютного спирта (1:1), затем 20 мл четыреххлористого углерода.

Колонку промывают абсолютным метанолом, который обязателен в случае применения для метилирования хлористого водорода, а при использовании йодистого метила он может быть заменен абсолютным этанолом. После промывания колонки зерна смолы слегка подсушивают воздухом, используя водоструйный насос, верхний тампон удаляют пинцетом и смолу переносят в широкую пробирку с притертой пробкой диаметром 29 мм.

Метилирование жирных кислот на ионообменной колонке. Для метилирования жирных кислот существуют два способа.

Способ 1: $\text{—N(R)}_3\text{OCOR} + \text{CH}_3\text{OH} + \text{HCl} \rightarrow \text{—N(R)}_3\text{Cl} + \text{CH}_3\text{OCOR} + \text{H}_2\text{O}$.

Для метилирования поглощенных смолы кислот ее заливают 5 мл 5—7%-ного метанольного раствора хлористого водорода, перемешивают до полного удаления пузырьков углекислого газа и оставляют в покое на 30 мин, после чего вновь тщательно перемешивают. Метанольный раствор переливают в делительную воронку с хорошо пришлифованным краном и смолу промывают двумя порциями эфира по 10 мл, сливая промывные растворы в ту же воронку. Затем в воронку прибавляют 20 мл холодной дистиллированной воды, содержимое ее тщательно перемешивают, водный слой удаляют, а эфирный раствор метиловых эфиров жирных кислот одновременно нейтрализуют и высушивают смесью 2 г безводного сернокислого натрия и 1 г бикарбоната натрия. Раствор осторожно упаривают и используют для ГХ-анализа.

Способ 2: $\text{—N(R)}_3\text{OCOR} + \text{CH}_3\text{I} \rightarrow \text{—N(R)}_3\text{I} + \text{CH}_3\text{OCOR}$.

К смоле добавляют 4—5 мл 10%-ного раствора йодистого метила в н-пентане и оставляют на сутки для метилирования жирных кислот. По окончании выдерживания смолу тщательно перемешивают, надосадочную жидкость сливают в чистую пробирку и смолу промывают несколькими миллилитрами пентана

или эфира. Объединенные растворы метиловых эфиров жирных кислот осторожно упаривают при комнатной температуре, после чего они готовы для ГХ-анализа.

Определение аминокислот

Ионообменную хроматографию наиболее широко используют для анализа аминокислот [56, 109, 154]. Кислые и оксиаминокислоты, проявляющие наименьшее сродство к катионообменной смоле, вымываются из колонки первыми, следующими элюируются нейтральные, а затем ароматические аминокислоты. Более сильно связываются смолой основные аминокислоты, и для вымывания их из колонки используют другой, менее кислый буферный раствор. При одноколоночном методе обычно дважды заменяют буферные растворы с различными значениями ионной силы и рН. Чтобы ускорить хроматографический процесс, применяют две колонки разных размеров, например: «большую» колонку $150 \times 0,9$ или $69 \times 0,9$ см для анализа кислых и нейтральных аминокислот при использовании двух буферных растворов, сменяемых один на другой в середине анализа; «малую» колонку $15 \times 0,9$ или $23 \times 0,9$ см для анализа основных аминокислот при использовании третьего буферного раствора с более высокой величиной рН.

Широкую популярность ионообменная хроматография аминокислот получила с появлением аминокислотных анализаторов, позволяющих автоматизировать почти все стадии анализа, за исключением подготовки пробы и количественного расчета содержания аминокислот в исследуемом образце, причем техника подсчета также может быть автоматизирована [154].

При изучении состава свободных аминокислот навеску измельченного продукта (3—5 г мяса или рыбы и 5—10 г муки или овощей) обрабатывают четыре-пять раз 80%-ным этиловым спиртом (продукты животного происхождения) или водой (растительные продукты). При этом применяют микроизмельчитель, а гомогенаты центрифугируют. Для удаления белков экстракты из продуктов можно обрабатывать хлороформом.

Затем водную фазу, содержащую свободные аминокислоты, очищают от примесей ионообменной смолой или упариванием досуха на вакуум-ротационном испарителе. Сухой остаток растворяют натрийцитратным раствором с рН 2,2, в который в качестве консерванта можно добавить фенол и каприловую кислоту. Для очистки растворов аминокислот на колонке используют отечественный катионит КУ-2 или импортные смолы Дауэкс-50, Зео-Карб-215, Зео-Карб-225 и др. [167]. Электронейтральные молекулы (например, сахара) и анионы в колонке не задерживаются, а аминокислоты и катионы адсорбируются ионообменными смолами. Колонку промывают 30—40 мл воды, которую отбрасывают, а аминокислоты элюируют, пропуская через ко-

лонку 50 мл 6 н. раствора NH_4OH со скоростью 1 мл/мин. Раствор аминокислот упаривают досуха в вакууме или на водяной бане, добавляют 15—20 мл воды и еще дважды повторяют выпаривание до удаления следов аммиака.

При общем анализе аминокислотного состава продукта белки и пептиды гидролизуют до составляющих их аминокислот. Навеску измельченного продукта, содержащую около 50 мг белков, в присутствии 6 н. HCl подвергают гидролизу в стеклянной запаянной ампуле путем нагревания в течение 24 ч при 110—120° С. После охлаждения гидролизат фильтруют, HCl от-

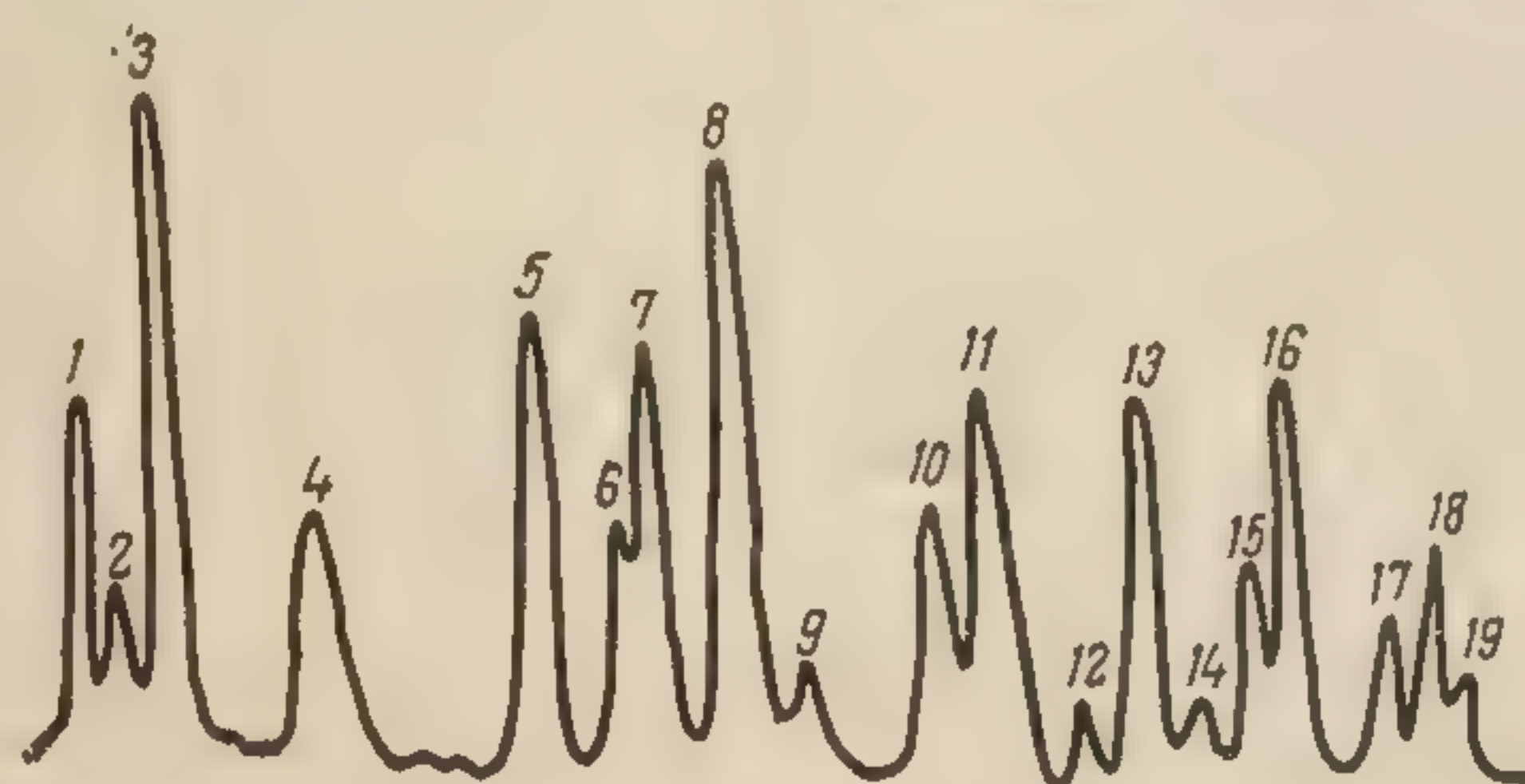


Рис. 19. Хроматограмма аминокислотного состава краснокочанной капусты, полученная на автоматическом аминокислотном анализаторе [98]:

1 — лизин; 2 — гистидин; 3 — аммиак; 4 — аргинин; 5 — аспарагиновая кислота; 6 — треонин; 7 — серин; 8 — глутаминовая кислота; 9 — пролин; 10 — глицин; 11 — аланин; 12 — цистин; 13 — валин; 14 — метионин; 15 — изолейцин; 16 — лейцин; 17 — тирозин; 18 — фенилаланин; 19 — γ -аминомасляная кислота

гоняют под вакуумом, несколько раз промывают дистиллированной водой до полного удаления запаха хлористого водорода. Упаренный досуха гидролизат растворяют в 10 мл натрийцитратного буфера с рН 2,2 и используют для анализа.

Автоматические аминокислотные анализаторы позволяют с минимальными затратами ручного труда провести анализ аминокислотного состава белковых гидролизатов или выделенных из продуктов смесей свободных аминокислот. Элюирующие буферные растворы вымывают из ионообменных колонок фракции аминокислот, обнаружение которых основано на широко известной цветной реакции α -аминокислот с нингидрином. При обычном режиме работы анализатора к жидкости, вытекающей из колонок с малой скоростью (20—130 мл/ч), добавляют буферизованный нингидриновый реагент и смесь подогревают при 100° С для развития окраски. В условиях постоянной скорости потока жидкости интенсивность окраски реакционной смеси измеряется проточным колориметром и регистрируется самописцем в виде кривой (рис. 19).

Содержание аминокислот в пробе рассчитывают по площадям пиков (см. стр. 61—63), причем точность определения количества вещества зависит от формы пика. Наилучшие результаты получаются в тех случаях, когда симметрия пика приближается к гауссовой форме. В целях гарантии достоверности результатов анализа рекомендуется подсчитывать площади таких пиков, у которых отношение высоты впадины над фоновой линией к высоте пика не превышает 0,40. Для ускорения подсчета площадей пиков могут быть использованы электронные и механические интеграторы. Разрабатываются методы автоматического расчета концентрации аминокислот в пробе, например только по высоте пика [154].

Чтобы определить количество каждой аминокислоты в абсолютных единицах, строят калибровочный график по лейцину. Так как продукты реакции разных аминокислот с нингидрином несколько различаются по интенсивности окраски (при одинаковой концентрации аминокислот), в расчетную формулу вводят так называемый коэффициент цветности, или цветовой выход [138, 246].

3.5.5. МОЛЕКУЛЯРНО-СИТОВАЯ (ЭКСКЛЮЗИОННАЯ, ИЛИ ГЕЛЕВАЯ) ХРОМАТОГРАФИЯ

Основы метода

Молекулярно-ситовая хроматография, широко применяемая для разделения белков [4, 7, 59, 186], позволяет фракционировать смеси веществ по размеру их молекул при использовании равномерного высокопористого неионогенного геля. Молекулы разделяемых веществ в зависимости от их размеров распределяются между свободным (подвижным) растворителем и неподвижным растворителем, заполняющим полости пористых частиц набухшего геля. Скорость прохода молекул через «гелевое сито» зависит от их способности проникать в гранулы и удерживаться в них.

Иными словами, время пребывания вещества в колонке соответствует скорости диффузии: молекулы вещества должны успеть проникнуть в доступную для них область (гранулы). Размеры и количество таких гранул определяются степенью сшивки геля, т. е. его способностью к набуханию.

В основе этой разновидности ЖХ, называемой чаще всего гель-хроматографией, лежит принцип эксклюзии, в соответствии с которым для данного вещества оказывается доступной лишь часть геля, причем, чем меньше размеры молекул, тем легче они проникают в гранулы и прочнее удерживаются в сетке набухшего полимера. Молекулы, превышающие определенные параметры, не проникают в гранулы и элюируются

в первых фракциях вместе со свободным объемом растворителя. Молекулы, проникшие в гранулы геля, элюируются последующими фракциями растворителя по мере уменьшения размеров их молекул, причем самые мелкие молекулы выходят из колонки последними [59, 162].

Однако эксклюзионный принцип этого вида хроматографии считается не вполне доказанным [154], а ситовой эффект и использование геля послужили основанием для закрепления более распространенных названий.

В зависимости от вида геля ситовую хроматографию подразделяют на гель-проникающую, которая осуществляется на липофильных полимерах, набухающих в органических растворителях, и гель-фильтрационную, основанную на использовании гидрофильных гелей.

В качестве носителя в гель-фильтрационной хроматографии наиболее широко применяется сефадекс. Это торговое название «сшитого» декстрана — высокомолекулярного полисахарида, получаемого микробиологическим путем из сахарозы и состоящего из остатков глюкозы. Высокое содержание в декстране гидроксильных групп делает его очень гидрофильным. «Сшивку» декстрана проводят эпихлоргидрином в щелочной среде. Получают гель декстрана (сефадекс) в виде гранул определенных размеров.

Фирма Pharmacia Fine Chemicals A, B, Упсала (Швеция) выпускает 8 типов сефадекса — от G-10 до G-200, различающихся по степени набухания. Для разделения мышечных глобулярных белков и пептидов с молекулярным весом от 4000 до 150 000 наиболее пригоден сефадекс G-100. Моносахариды хорошо разделять на сефадексе G-10 [59]. Гель выпускают в виде порошка, но он сохраняется и в набухом состоянии в колонке, если в качестве консерванта в буферный раствор добавить 0,02% азидата натрия.

При хроматографировании набухшим гелем заполняют колонку длиной 20—250 см и диаметром 20—50 мм, вносят образец и при постоянной скорости элюируют растворителем фракции разделяемых веществ. Анализ распределения веществ в элюате можно проводить разными способами: измерением поглощения в УФ-области спектра, по сухому остатку, с помощью цветных реакций [59]. Выход белков из колонки обычно контролируют по оптической плотности элюатов при 280 нм, иногда при 230 или 310 нм. Характеристикой каждого вещества для конкретных условий опыта служит время удерживания, определяемое временем, прошедшим от начала анализа до момента выхода максимума пика, т. е. максимальной оптической плотности. Количественный анализ веществ основан на том, что площадь каждого пика на хроматограмме пропорциональна концентрации соответствующего этому пику компонента смеси (см. стр. 61—66).

Хроматография белков на молекулярных ситах

Белки извлекают из продукта фракционированием по растворимости их в различных растворителях. Экстракцию белков проводят либо непосредственно из навески измельченного продукта, либо после предварительного обезвоживания и обезжиривания его путем обработки холодным ацетоном температурой -10°C при соотношении 1:10 и более, в зависимости от содержания влаги и жиров в объекте исследования [4]. Затем ацетон отфильтровывают, а продукт сушат в вакууме при комнатной температуре. Выделенные по растворимости фракции белков хроматографируют на молекулярных ситах [9, 38, 186, 187].

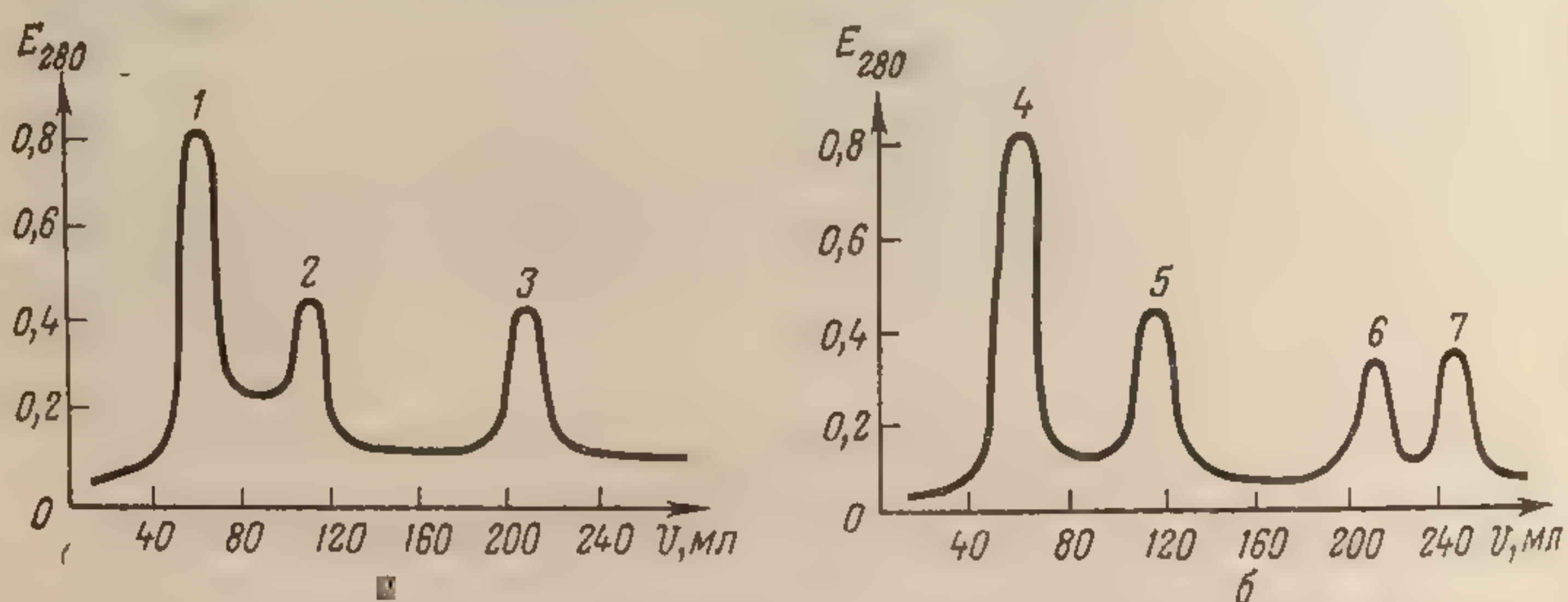


Рис. 20. Хроматограммы миофибриллярных (а) и саркоплазматических (б) белков живого карпа [9]:

1 — актомиозин+миозин; 2 — ф-актин; 3 — г-актин+тропомиозин; 4 — глобулин; 5 — миоген; 6 — миоальбумин; 7 — низкомолекулярные азотистые вещества

Экстракция мышечных белков проводится следующим образом [232]. К 10—15 г измельченной рыбы, мяса или другого белкового продукта животного происхождения (к 2—4 г обезвоженной и обезжиренной навески) приливают 50 мл охлажденного фосфатного буфера с рН 7,5 и ионной силой 0,05. Смесь гомогенизируют в течение 3 мин с перерывами по 10 сек через каждую минуту и оставляют в холодильнике на 14—16 часов. Затем гомогенат центрифугируют 30 мин при 6000 об/мин и температуре $0-4^{\circ}\text{C}$. Жидкость сливают, а остатки в пробирках еще дважды подвергают обработке таким же буфером. Все декантаты объединяют, фильтруют и доводят буфером объем до 250 мл.

В экстракте находятся саркоплазматические белки и низкомолекулярные азотистые вещества. Остатки тканей подвергают гомогенизации в 50 мл охлажденного фосфатного буфера с рН 7,2 и ионной силой 0,5 и аналогично саркоплазматическим белкам выделяют миофибриллярные белки, переходящие в раствор. Остаток тканей гомогенизируют в 50 мл охлажденного раствора 0,1 н. NaOH описанным выше способом. В экстракте получают

денатурированные белки. Остаток тканей содержит белки стромы (коллаген и эластин), количество которых можно определить по присутствующему в них оксипролину.

Содержание белков ($N \times 6,25$) в каждой фракции определяют общепринятыми методами, например по Кьельдалю или в модификации Конвея. Для определения небелкового азота навеску продукта обрабатывают фосфатным буфером с pH 7,2 и ионной силой 0,5. Белки в экстракте осаждают 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты.

Хроматографическое разделение мышечных белков проводят на сефадексе G-100, который предварительно замачивают в фосфатном буфере и оставляют на трое суток для набухания. Набухшим сефадексом заполняют колонку (лучше размером $60 \times 2,5$ см) и в течение суток пропускают через нее буфер со скоростью 30—35 мл/ч. После этого осторожно наслаивают пипеткой 4—5 мл экстракта, содержащего 5—10 мг белков. По окончании полного впитывания белкового экстракта пропускают буферный раствор и с помощью автоматического фракционирования собирают элюат в течение 8—10 ч. Оптическую плотность элюатов измеряют на спектрофотометре при 280 нм против буферного раствора, вытекающего из колонки в первую пробирку. На основании полученных результатов строят кривую (рис. 20).

В качестве растворителей для элюирования белков из колонки используют фосфатные буферы с pH 7,5 и ионной силой 0,05 ($0,00338M \text{ KH}_2\text{PO}_4 + 0,0155M \text{ Na}_2\text{HPO}_4$) и с pH 7,2 и ионной силой 0,5 (получают добавлением к первому раствору хлористого калия до концентрации $0,45M \text{ KCl}$).

Количественное соотношение фракций белков в продукте определяют отношением площади каждого пика к суммарной площади всех пиков хроматограммы. Приемы расчета площадей пиков изложены на стр. 61—63.

* * *

Хроматографические методы исследования пищевых продуктов в настоящее время стали очень популярными и находят все более широкое применение.

4

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

4.1. ОСНОВЫ МЕТОДА

Люминесценцией называют свечение атомов, ионов, молекул и других более сложных частиц вещества, которое возникает в результате перехода в них электронов при возвращении из возбужденного состояния в нормальное. Чтобы вещество начало люминесцировать, к нему необходимо извне подвести определенное количество энергии. Частицы вещества, поглощая энергию, переходят в возбужденное состояние, пребывая в нем некоторое время. Затем они возвращаются в состояние покоя, отдавая при этом часть энергии возбуждения в виде квантов люминесценции.

Свечение, возникающее под действием световых лучей оптического диапазона ультрафиолетовых (УФ) и видимых частот, носит название **фотолюминесценции**, которая в зависимости от вида возбужденного уровня и времени пребывания в нем подразделяется на флуоресценцию и фосфоресценцию [19].

Флуоресценция — это вид собственного свечения вещества, которое продолжается только при облучении. Если источник возбуждения устранить, то свечение прекращается мгновенно или спустя не более 0,001 сек.

Фосфоресценцией называют собственное свечение вещества, которое продолжается после отключения возбуждающего света.

Для исследования пищевых продуктов используют явление флуоресценции.

С помощью люминесцентного анализа (ЛА) можно обнаружить в исследуемом образце присутствие вещества в концентрации 10^{-11} г/г. Качественный и количественный ЛА используют для определения некоторых витаминов в пищевых продуктах, содержания белков и жиров в молоке, исследования свежести мяса и рыбы, диагностики порчи овощей, плодов и обнаружения в продуктах питания консервантов, лекарственных препаратов, канцерогенных веществ, пестицидов.

При проведении ЛА учитывают основные закономерности, присущие молекулярному свечению [19]. Например, закон не-

зависимости спектра люминесценции от длины волны возбуждающего света позволяет пользоваться для возбуждения сравнительно широкими спектральными участками при отсутствии вторичного поглощения.

Согласно правилу Стокса—Ломмеля, спектр излучения в целом и его максимум всегда сдвинуты по сравнению со спектром поглощения и его максимумом в сторону длинных волн (рис. 21). Закон Стокса—Ломмеля строго выполняется для большинства веществ, причем сдвиг спектров люминесценции относительно спектров поглощения дает возможность отфильт-

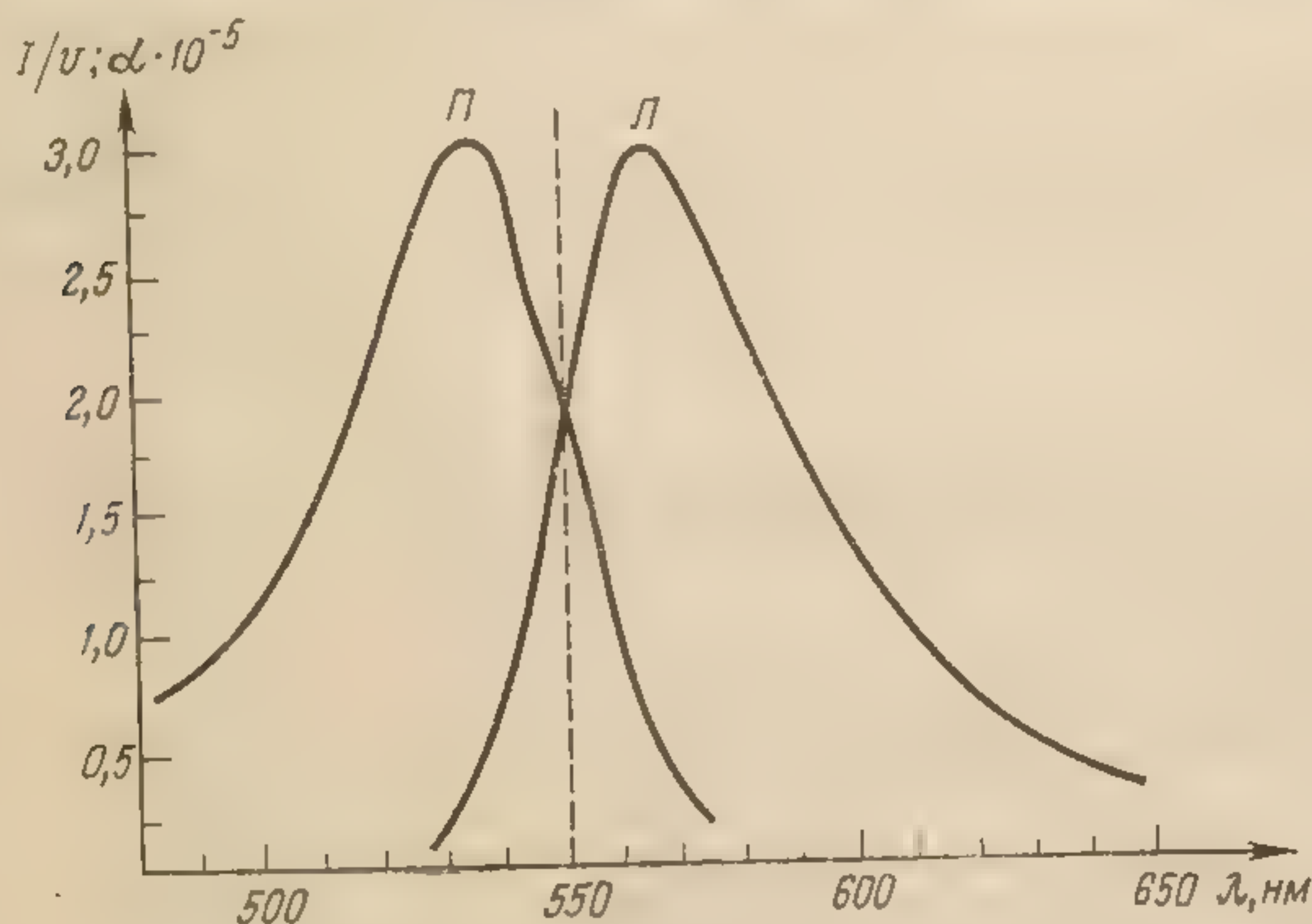


Рис. 21. Спектры поглощения (П) и люминесценции (Л) красителя родамина 6Ж в ацетоне [120]

ровать рассеянную часть возбуждающего света, примешивающегося к люминесценции.

Полноту преобразования возбужденной энергии в люминесценцию характеризуют понятием «энергетический выход» ($B_{\text{эл}}$). Излучаемая энергия по сравнению с поглощаемой может достигать 80—90%. С. И. Вавиловым установлено, что $B_{\text{эл}}$ люминесценции возрастает пропорционально длине волны возбуждающего света, затем в некотором спектральном интервале остается постоянным, а в области наложения спектров поглощения и люминесценции начинает быстро падать (рис. 22, а).

Понятие «квантовый выход» ($B_{\text{кв}}$) показывает, какая часть квантов преобразуется в люминесцентные кванты. При подборе оптимальных условий проведения опыта широко используется закон С. И. Вавилова, по которому люминесценция сохраняет постоянный $B_{\text{кв}}$, если возбуждающая волна преобразуется в среднем в более длинную, чем она сама, и, наоборот, выход люминесценции резко уменьшается, если длинные волны воз-

буждения преобразуются в короткие (рис. 22, б). В ЛА необходимо учитывать, что избыточная энергия коротковолновых квантов не увеличивает интенсивности люминесценции (ИЛ).

При расшифровке спектров люминесценции принимается во внимание установленное В. Л. Левшиным [120] правило зеркальной симметрии спектров поглощения и излучения, которое выполняется для многих веществ (см. рис. 21).

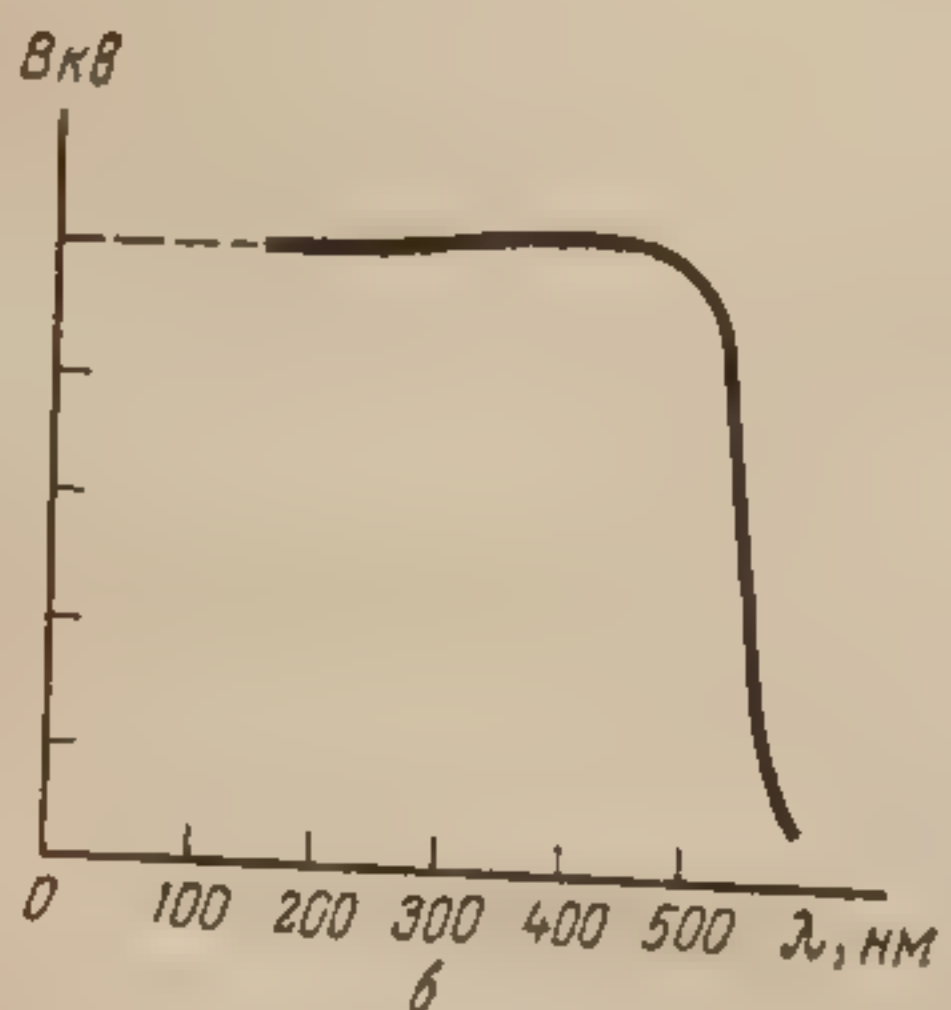
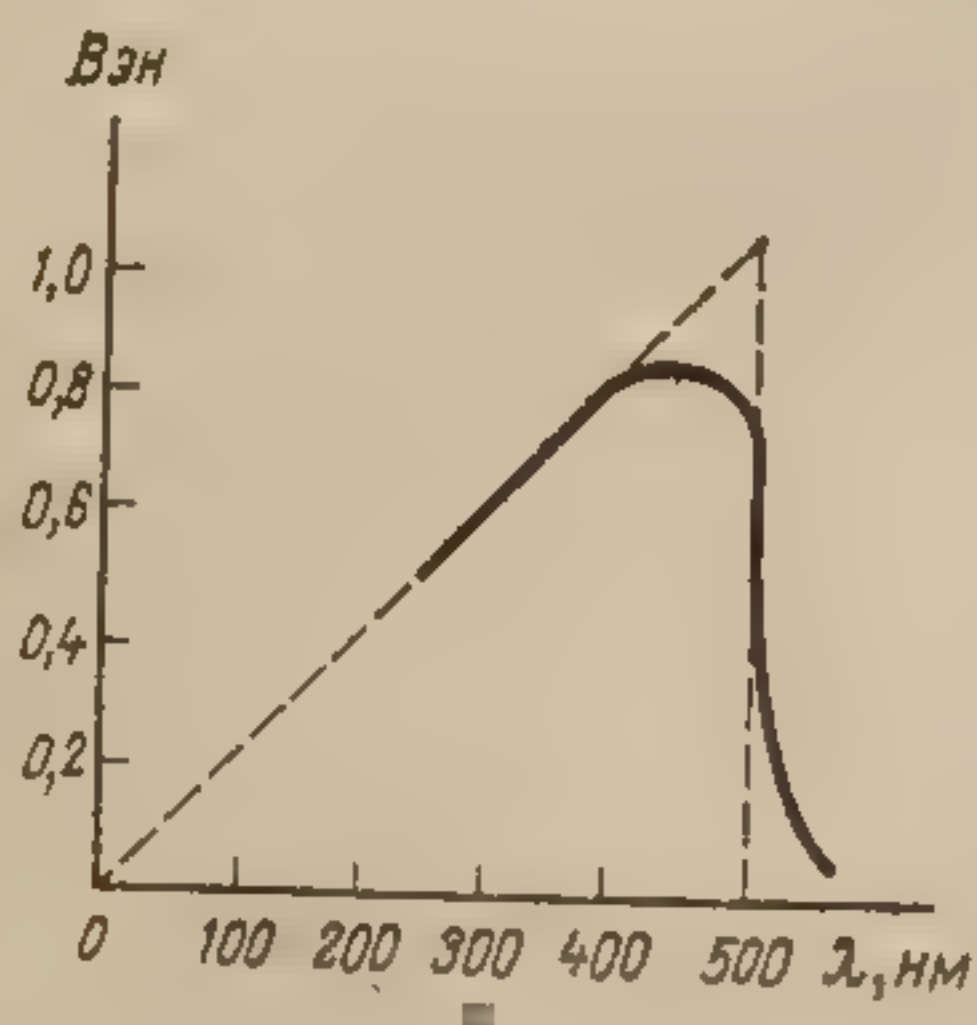


Рис. 22. Зависимость энергетического (а) и квантового (б) выхода флуоресценции водного раствора флуоресцеина от длины волны возбуждающего света. Закон С. П. Вавилова [19]

ИЛ при заданных условиях возбуждения определяется числом излучающих центров вещества, т. е. его концентрацией. Однако ИЛ пропорциональна концентрации люминесцирующего вещества только в тех случаях, когда содержимое его в растворе не превышает 10^{-4} — 10^{-5} г/мл. При более высоких концентрациях в растворе наблюдается концентрационное «тушение», называемое также «самотушением», которое может уменьшить ИЛ [128]. Факт концентрационного «тушения» можно установить разбавлением раствора.

«Тушение» люминесценции вызывается также наличием посторонних примесей. Нелюминесцирующие примеси, перехватывая энергию как возбуждения, так и люминесценции, изменяют ИЛ вещества. Если примесь люминесцирует, то своим свечением она создает фон, искажающий результаты исследования. В таких случаях до проведения ЛА исследуемый продукт очищают от примесей осаждением, экстракцией, хроматографией и другими методами. Целесообразно также обезгаживание продукта, так как некоторые газы, особенно кислород, могут «тушить» люминесценцию.

У многих флуоресцирующих растворов наблюдается «тушение» при повышении температуры, называемое «температурным тушением». С понижением температуры возрастает ИЛ и улучшается структура спектра. В ряде случаев соединения, не люминесцирующие при комнатной температуре, начинают люминесцировать при низкой температуре. В практике научных исследований широко применяется жидкий азот. Для разделения канцерогенных веществ, в частности бензпиренов, зарекомендовал себя метод квазилинейчатых спектров флуоресценции при низкой температуре, разработанный Э. В. Шпольским. Высокая точность анализа получена при определении ароматиче-

ских многоядерных углеводов по квазилинейчатым спектрам в замороженных при температуре жидкого азота и-парафиновых растворах.

В ЛА применяют фотовозбуждение, освещая исследуемый объект коротковолновой частью видимого спектра (фиолетовыми и синими лучами с диапазоном волн 380—485 нм) или УФ-радиацией, чаще в диапазоне длинноволнового ультрафиолета (320—380 нм) и реже в диапазонах средне- и коротковолнового ультрафиолета (280—320 и 200—280 нм).

Красные и инфракрасные лучи в диапазоне 700—1000 нм, возможно, в будущем найдут применение в ЛА. В некоторых работах [60, 128] показано, что различные вещества, и в том числе пищевые продукты, обладают красной и инфракрасной люминесценцией.

Чтобы свет источника в видимой области спектра не мешал наблюдению и измерению люминесценции, его обычно убирают с помощью специальных светофильтров, пропускающих возбуждающее излучение и поглощающих мешающую часть спектра.

В ЛА наибольшее распространение в качестве источников света получили ртутные лампы, основанные на использовании газового разряда в парах ртути. Так как по закону Стокса—Ломмеля спектр люминесценции всегда сдвинут в сторону длинных волн по отношению к спектру поглощения, для возбуждения люминесценции чаще используют длинноволновую УФ-область спектра, выделяя отдельные участки этого спектра с помощью светофильтров марок УФС, называемых также «черными стеклами», которые изготавливают из стекла, окрашенного окисью никеля. Светофильтры УФС непрозрачны для большей части видимого спектра, но хорошо пропускают УФ-лучи. Стекло УФС-1 выделяет область спектра от 250 до 400 нм. Фильтр УФС-2 пропускает лучи с длиной волны от 270 до 330 нм. Светофильтр УФС-3 (стекло Вуда) выделяет спектральный участок от 320 до 400 нм с максимумом пропускания около 360 нм. Фильтр УФС-4 характеризуется областью пропускания от 340 до 390 нм. Иногда применяют жидкие светофильтры в виде растворов неорганических солей — K_2CrO_4 , $CuSO_4$, $NiSO_4$, $CoSO_4$ и др.

Однако все марки «черных стекол» пропускают длинноволновую радиацию, начиная от 650 нм, к которой чувствительны некоторые люминесцентные приборы с фотоэлементами. Для устранения этой области спектра используют метод скрещенных светофильтров, предусматривающий установку дополнительного, так называемого вторичного светофильтра перед фотоэлементом прибора. Хорошо поглощают длинноволновую радиацию вторичные жидкостные светофильтры, состоящие из водного раствора сернокислой меди с добавлением водного раствора аммиака.

4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Визуальные наблюдения за цветом люминесценции могут быть использованы для диагностики порчи плодов и овощей, определения сорта муки и мяса, обнаружения природы молочных продуктов, пищевых жиров, установления безвредности некоторых продуктов питания.

Здоровый картофель на разрезе имеет желтую флуоресценцию, которая при поражении картофеля фитофторой становится интенсивно голубой, при подмораживании — беловатой, при поражении кольцевой гнилью — зеленоватой, при появлении вирусных заболеваний — разного цвета преимущественно в сосудистой части клубня. Лимоны и апельсины имеют желтую флуоресценцию с голубоватым оттенком, мандарины — темно-оранжевую с фиолетовым оттенком. При поражении голубой плесенью появляется темно-синяя флуоресценция в виде пятен в местах поражения [60].

Изменение цвета флуоресценции свежих плодов и овощей позволяет обнаружить начало порчи их на очень ранней стадии, неуловимой другими методами. ЛА может быть эффективным при сортовом отборе плодов и овощей, направляемых на хранение, а также предназначенных для длительного транспортирования или консервирования. В последнем случае резко сокращается брак консервов [128].

В южных районах применим простейший солнечный люминескоп «с черным стеклом», отфильтровывающим УФ-радиацию из солнечного света.

Изменение цвета люминесценции позволяет выявить некоторые дефекты пищевых продуктов. Присутствие *Cysticercus cellulosae* и *Cysticercus bovis* в мясе обнаруживается по ярко-розовым точкам, характерная флуоресценция которых обусловлена составом жидкости в личинках гельминтов [128].

По цвету флуоресценции можно судить о природе и доброкачественности молока и молочных продуктов [60]. Свежее молоко от здоровых коров имеет флуоресценцию ярко-желтого цвета, молоко от коров с больным выменем, а также молоко с добавлением соды или 15% воды флуоресцирует бледными желтоватыми тонами. Молоко кобылиц имеет голубую и синюю люминесценцию. По цвету флуоресценции можно выявить случаи фальсификации молока и диагностировать мастит [142]. Методом флуоресцентной микроскопии обнаруживается присутствие в молоке бактерий группы кишечной палочки, обладающих сильной зеленовато-желтой флуоресценцией. Для усиления контраста добавляют конго-рубин или аголитмин. Наличие туберкулезных бацилл в молоке выявляется по характерной флуоресценции их в виде ярко-желтых палочек на темном фоне. Сыр с незрелым тестом флуоресцирует на разрезе желтым цве-

том. При созревании сырного теста флуоресценция приобретает оттенок от серо-синего до фиолетового.

Некоторые различия по цвету люминесценции имеют растительные масла. Флуоресцентным методом можно обнаружить примесь минеральных масел в растительных. Топленые животные жиры (говяжий, свиной, бараний) не флуоресцируют, коровье масло имеет канареечно-желтую флуоресценцию, а маргарин — голубую. Этот признак позволяет определить простым методом примесь маргарина в животных жирах [60].

ЛА позволяет установить степень окисленности пищевых жиров [85, 107]. В пробирку из нефлуоресцирующего стекла помещают 3—4 мл исследуемого масла, добавляют такое же количество дистиллированной воды и 3—4 капли 10%-ного водного раствора аммиака. Интенсивно встряхивают и центрифугируют до четкого разделения в пробирке водной и жировой фаз. Люминесценцию определяют с помощью прибора ОЛД-41. В потоке УФ лучей наблюдают свечение водного слоя. При содержании окисленных веществ более 1% происходит отчетливое голубое свечение, от 0,5 до 1% — зеленоватое свечение с голубовато-дымчатым оттенком; если содержание окисленных веществ не превышает 0,5%, то появляется зеленая люминесценция [107].

Наблюдением за цветом флуоресценции муки можно определить ее сорт, вид и наличие в ней вредных примесей. Оболочки, алейроновый слой и зародыш зерновки пшеницы и ржи имеют более интенсивное синее свечение по сравнению с эндоспермом [128]. Следовательно, чем ниже сорт муки, тем более яркой флуоресценцией обладает продукт. Разные виды муки также различаются по цвету свечения. Ячменная мука имеет матово-белую флуоресценцию, гороховая — розовую, соевая — сине-зеленую. Частицы спорыньи флуоресцируют темно-оранжевым цветом. Мука с наличием спорыньи приобретает фиолетовое мерцающее свечение. На цвет и интенсивность флуоресценции влияют и другие факторы. Например, при высушивании пшеничной и ржаной муки флуоресценция изменяется от блестящей голубой до желтой. При хранении зерна и муки появляются различные оттенки в цвете флуоресценции.

Визуальным наблюдением за люминесценцией можно характеризовать степень свежести яичных продуктов. Например, свежие куриные яйца с белой скорлупой имеют интенсивную красную флуоресценцию, при хранении цвет флуоресценции становится голубым. В процессе хранения куриных яиц с темной скорлупой в люминесценции появляются голубовато-фиолетовые тона [60].

С помощью качественного ЛА можно определить вид мяса и дать ориентировочную оценку его сортности. Мышечная ткань мяса животных обладает собственной флуоресценцией красновато-коричневых тонов, причем для мышц говядины характерны

бархатистые темно-красные оттенки, для баранины — темно-коричневые, для свинины — светло-коричневые. Собственно-соединительная (сухожилия, фасции) и хрящевая ткани люминесцируют ярким голубым цветом, а жировая ткань имеет светло-желтое свечение [54].

При порче мяса изменяется цвет его флуоресценции. На первой стадии порчи на темно-красном флуоресцирующем фоне мышечной ткани говядины появляются зеленые точки, которые расширяются по мере углубления порчи продукта. Несвежие мышцы флуоресцируют темно-красным цветом со сплошным зеленым налетом [54].

Фотоэлектрические измерения ИЛ позволяют судить о степени свежести рыбы и мяса. Сила тока, возникающего в цепи фотоэлемента, пропорциональна световому потоку люминесценции, падающему на фотоэлемент. Сила тока измеряется гальванометром. Предварительная градуировка шкалы позволяет измерить ИЛ без непосредственного сравнения опытного образца с контрольным.

Для определения свежести мяса и рыбы сконструированы люминесцентные приборы [70, 99]. Фотометр Данилова и Кондратенко [99] имеет несколько шкал для регистрации люминесцентных излучений различной интенсивности. При оценке свежести мяса измельченную навеску продукта смешивают с дистиллированной водой в соотношении 1:10 и готовят экстракт. Водные вытяжки из свежего говяжьего мяса характеризуются желто-зеленой люминесценцией. Экстракты мяса подозрительной свежести флуоресцируют зелено-голубым цветом. Экстракты несвежего мяса имеют свечение молочного цвета. ИЛ водных вытяжек из свежего парного и охлажденного мяса очень мала и практически не измеряется прибором. Для свежего мороженого мяса характерна ИЛ вытяжек в пределах от 2 до 10 мксб в максимуме спектра 528—544 нм. При порче мяса ИЛ водных экстрактов возрастает, и несколько смещаются максимумы спектров люминесценции в сторону коротких волн. Экстракты мяса сомнительной свежести в максимуме спектра 512—516 нм имеют ИЛ 20—30 мксб. Вытяжки из несвежего мяса люминесцируют с максимумом спектра 498—502 нм, ИЛ увеличивается до 40—50 мксб. Метод позволяет в течение нескольких минут определить степень свежести мяса.

ЛА свежести рыбы рекомендуется проводить при возбуждении в области 360—365 нм; при этом свечение водных экстрактов и срезов мышц пресноводных и морских рыб наблюдается в области 420—640 нм. В процессе порчи рыбы ИЛ возрастает в области 440—460 нм [55]; pH рыбы не влияет на ИЛ в этой области спектра. Полагают [69], что нарастание ИЛ при порче рыбы связано с увеличением микробиологической обсемененности продукта, так как чистые культуры гнилостных микроорганизмов при возбуждении в области 360—365 нм люминесци-

руют в области 400—600 нм с максимумом спектра при 460 нм, причем с увеличением концентрации микрофлоры в водных взвешках ИЛ возрастает. Коэффициент корреляции между количеством микроорганизмов в мышцах охлажденного судака и ИЛ в максимуме 0,84.

Предложены параметры свежести рыбы по ИЛ в максимуме, определяемой фотометром [70] при возбуждении в области 360—365 нм. В соответствии с этими параметрами рыбу делят на два типа. К I типу относят виды рыб со слабыми люминесцентными свойствами: карп, судак, щука, треска, окунь; ко II типу — виды рыб с выраженными люминесцентными свойствами, например палтус [69].

Зависимость ИЛ от степени свежести рыбы видна из приведенных ниже данных [69]:

Степень свежести рыбы	Интенсивность люминесценции, <i>мкА</i>	
	I тип	II тип
Свежая	25—50	50—70
Сомнительной свежести . .	60—80	120—140
Несвежая	100—180	160—200

Усовершенствованный люминесцентный фотометр [70], предназначенный для определения свежести рыбы, позволяет проводить экспресс-анализ непосредственно на поверхности рыбы и может быть использован при сортировке рыбы по качеству.

4.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Количественный ЛА позволяет определить концентрацию исследуемого вещества в растворе по ИЛ. Техника количественного анализа основана на том, что при небольшом содержании флуоресцирующего вещества в растворе существует пропорциональная зависимость между яркостью свечения и концентрацией вещества в пробе. Наиболее удобно проводить сравнение по ИЛ раствора неизвестной концентрации с эталонным раствором. По концентрации вещества в стандартных растворах рассчитывают содержание вещества в пробах.

Можно пользоваться также предварительно построенным калибровочным графиком, но этот метод менее надежен, так как на люминесценцию влияет много факторов (см. стр. 160) и при проведении ЛА очень важно создание идентичных условий для исследуемого и стандартного растворов. При отсутствии у исследуемых веществ собственной люминесценции используют вторичную флуоресценцию продуктов реакции нефлуоресцирующего вещества с флуорохромами.

В количественном ЛА применяют люминесцентные фотометры, которые часто называют флуориметрами, или флуорометрами [217].

Для определения витаминов в пищевых продуктах и исследования окислительных процессов в жирах обычно используют

флуорометр ЭФ-3. Разработаны приборы, предназначенные для определения количества белков и жиров в молоке. Если в состав исследуемой пробы входит несколько флуоресцирующих веществ, то с помощью специальных спектральных приборов энергию излучения разлагают в спектр, при этом интенсивность излучения регистрируют фотоэлектрическим или фотографическим способом [197].

При отсутствии флуорометров для фотоэлектрической регистрации ИЛ иногда используют монохроматоры, спектрофотометры или спектроскопы со специальными насадками [34].

4.3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ЖИРОВ В МОЛОКЕ

Белки молока обладают собственной (первичной) флуоресценцией в УФ-области спектра. ИЛ в максимуме 340—350 нм пропорциональна концентрации белков в молоке. На этом явлении основан флуоресцентный экспресс-метод определения белков в молоке, разработанный С. В. Коневым и И. И. Козуниным. Сконструированный ими флуоресцентный протейнометр позволяет за 3—5 мин с точностью до 0,1% определить содержание белков в молоке [102]. Более поздние исследования показали, что на ИЛ наряду с концентрацией белков оказывает влияние структура белковых молекул, изменяющая $V_{\text{кв}}$ флуоресценции [103]. Для устранения структурного фактора и стабилизации $V_{\text{кв}}$ флуоресценции С. В. Коневым [100] предложено два способа: мономеризация белков 8М мочевиной и агрегация белков молока формальдегидом или хлористым кальцием.

Определение жиров в молоке основано на вторичной флуоресценции, создаваемой флуорохромированием жировой фазы молока, так как молочный жир не обладает собственной флуоресценцией. Красителем может служить 0,05%-ный раствор фосфина-3-солянокислого, который при нагревании в течение минуты на кипящей водяной бане избирательно и объемно флуорохромует жировые шарики. ИЛ определяют в тонком слое (1 мм) на просвет. Метод применим для анализа молока цельного, обезжиренного и топленого, а также для определения жира в кефире, простокваше, ряженке [101].

Во ВНИИнаучприборе Министерства приборостроения, средств автоматизации и систем управления разработан автоматический флуоресцентный жиросмер ФЖ-1, серийное производство которого организовано с 1973 г. Прибор предназначен для определения содержания жира в молоке. Принцип действия основан на измерении ИЛ жировой фазы молока, объемно флуорохромированной красителем. Диапазон измерения содержания жира в молоке от 0,05 до 6,5%. Среднее квадратическое отклонение результатов исследования от показателя жирности, определяемого по методу Розе—Готлиба, составляет 0,06%. Продолжительность анализа 2 мин.

4.3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ (ТИАМИНА, РИБОФЛАВИНА, ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ)

ЛА широко применяют для определения витаминов B_1 , B_2 и группы фолиевой кислоты в пищевых продуктах.

Определение витамина B_1 (тиамина, или аневрина)

Витамин B_1 не обладает собственной флуоресценцией, но щелочные растворы его легко окисляются с образованием тиохрома, водно-щелочные растворы которого флуоресцируют синим цветом с максимумом интенсивности свечения при 460—470 нм.

Определение этого витамина состоит в следующем. Навеску продукта подвергают гидролизу. Если в продукте тиамин содержится преимущественно в свободном виде, то ограничиваются кислотным гидролизом. Для определения связанной формы витамина проводят гидролиз ферментом с сильной диастатической активностью. Из раствора тиамин лучше выделять адсорбцией на стеклянной хроматографической колонке, заполненной силикагелем, с последующим элюированием витамина из адсорбента кипящим кислым раствором KCl . Затем тиамин окисляют щелочным раствором $K_3Fe(CN)_6$.

Полученный тиохром извлекают из раствора изобутиловым, бутиловым или изоамиловым спиртом. Спиртовой раствор тиохрома отделяют от воды и измеряют ИЛ с помощью флуорометра ЭФ-3, снабженного первичным светофильтром, который пропускает УФ-излучение в диапазоне 320—390 нм, и вторичным фильтром с полосой пропускания 400—580 нм. Лучшие результаты получаются при использовании светофильтров с более узким диапазоном пропускания: для входного фильтра с максимумом около 365 нм и для выходного фильтра с максимумом около 435 нм.

Содержание тиамина определяют по расчетной формуле, сравнивая по ИЛ испытуемый окисленный раствор тиохрома со стандартным окисленным раствором. Для проверки воспроизводимости флуорометра можно пользоваться стандартным раствором двусернокислого хинина.

В литературе имеются подробные сведения об определении тиамина в пищевых продуктах [58, 67, 137].

Определение витамина B_2 (рибофлавина)

Витамин B_2 присутствует в пищевых продуктах в четырех формах: свободный рибофлавин, моонуклеотид и флавинадениндинуклеотид рибофлавина, прочно связанный с белком нуклеотид. Нейтральные водные или спиртовые растворы свободного рибофлавина и его моонуклеотида флуоресцируют желто-зе-

ленным цветом; полоса флуоресценции находится в области 513—613 нм с максимумом при 565 нм. С изменением рН в кислую или щелочную сторону происходит «тушение» флуоресценции. ИЛ динуклеотида рибофлавина в 6—10 раз слабее по сравнению со свободным витамином или его моонуклеотидом. Связанные с белком формы рибофлавина не обладают флуоресценцией. Поэтому при определении общего количества витамина В₂ проводят выделение рибофлавина из связанных с белком и нуклеотидных форм.

Для разрушения прочной связи рибофлавина с белком предварительно подготовленную навеску продукта подвергают ферментативному или кислотному гидролизу. В первом случае применяют трипсин, панкреатин или ферментный препарат из мицелия пенициллина. Из нуклеотидных соединений рибофлавина можно освободить обработкой профильтрованного гидролизата раствором трихлоруксусной кислоты. Реже применяют для этой цели фосфатазные препараты. Затем раствором K_2HPO_4 доводят рН до 6 и окисляют опытный раствор перманганатом калия с последующим восстановлением. Окислением стремятся исключить влияние флуоресцирующих примесей на результаты определения витамина.

ИЛ рабочего и стандартного растворов измеряют прибором ЭФ-3 с первичным светофильтром, имеющим полосу пропускания 350—480 нм, и вторичным фильтром, пропускающим лучи в области спектра 510—650 нм.

В расчетной формуле учитывают также остаточную флуоресценцию рабочего раствора, измеряемую после «тушения» флуоресценции рибофлавина путем обработки рабочего и стандартного растворов двууглекислым натрием или гидросульфитом натрия. Флуоресценция стандартного раствора рибофлавина после обработки обычно «гасится» до нуля; в опытном же растворе остается небольшая флуоресценция, обусловленная присутствием флуоресцирующих примесей, часть которых сохраняется, несмотря на тщательную обработку вытяжки.

ЛА рибофлавина выполняется в нескольких модификациях [58, 67, 112, 137].

Разработаны флуорометрические экспресс-методы определения витамина В₂ в пищевых продуктах [128].

Определение витаминов группы фолиевой кислоты

Витамины этой группы не обладают собственной флуоресценцией. При окислении образуется производное, имеющее голубую флуоресценцию с максимумом при 470 нм.

Флуорометрический метод определения фолиевой кислоты состоит в следующем. Навеску продукта подвергают ферментативному гидролизу для выделения связанных форм витамина. Фолиевую кислоту адсорбируют из гидролизата активирован-

ным углем или другим адсорбентом, затем элюируют витамины слабым раствором аммиака. NH_3 отгоняют, а жидкость, содержащую витамины, окисляют KMnO_4 и H_2O_2 .

ИЛ раствора измеряют при рН 4,0—4,5 на приборе ЭФ-3 с первичным светофильтром, имеющим максимум пропускания около 365 нм, и вторичным фильтром с максимумом пропускания около 470 нм. Из показания флуорометра вычитают ИЛ контрольного раствора, приготовленного аналогично опытному, но без навески продукта.

В расчетной формуле учитывают ИЛ стандартного раствора, концентрацию в нем фолиевой кислоты и разведения, выполняемые по ходу работы.

Подробное описание флуорометрического метода определения фолиевой кислоты имеется в литературе [112].

4.3.3. КОНТРОЛЬ ЗА БЕЗВРЕДНОСТЬЮ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Определение полициклических ароматических углеводородов (ПАУ)

ПАУ присутствуют в продуктах растительного происхождения и копченостях [147]. В овощах и злаковых культурах обнаружено до 13 ПАУ, которые попадают в растения главным образом из почвы [214]. Источниками попадания ПАУ в пищевые продукты служат также вода [81], воздух [53], копильный дым [48]. В городском воздухе, например, присутствует до 15 ПАУ, в том числе 3,4-бензпирен (по современной терминологии бенз(а)пирен) — вещество сильного канцерогенного действия. Бенз(а)пирен (БП) и другие ПАУ обнаружены в маслах: оливковом, кукурузном, подсолнечном, хлопковом и др. Концентрация БП в производственных образцах растительных масел колеблется от 0,2 до 10 мкг/кг [49]. Это вещество хорошо растворимо в маслах и концентрируется в них в процессе производства из плодов и семян масличных культур.

Наибольшее количество БП обнаружено в липидах, содержащихся в плодовой оболочке семян масличных культур. При сушке семян подсолнечника количество БП в них может увеличиваться вследствие загрязнения продуктами неполного сгорания топлива в камерах.

Содержание БП в рыбе горячего копчения, приготовленной традиционным дымовым способом, а также в копченых и полукопченых колбасах от 1 мкг до нескольких десятков мкг на 1 кг продукта. В рыбе холодного копчения и в вареных колбасах концентрация БП колеблется от 0,2—0,3 до 1 мкг/кг [63].

Высокое содержание БП обнаружено в табачном дыме [62].

Определение БП и других канцерогенных ПАУ проводится по тонкой структуре спектра флуоресценции при низкой темпе-

ратуре. Для исследования пищевых продуктов наибольшее применение получает разработанная П. П. Дикуном методика определения канцерогенных ПАУ, в частности БП [64].

Спектрально-флуоресцентный метод определения БП [136] включает несколько этапов: извлечение из навески продукта фракции, содержащей ПАУ; очистку полученной фракции от примесей и хроматографическое разделение ПАУ; качественное определение БП и других ПАУ по спектрам люминесценции при температуре жидкого азота; количественное определение БП с помощью одной из модификаций спектрально-флуоресцентного способа (методом добавок или методом внутреннего стандарта).

Методика определения БП в копченых продуктах и растительных маслах. К 1 кг фарша копченого продукта приливают 1 л этилового спирта, добавляют 150—250 г КОН (в зависимости от содержания жиров в продукте) и кипятят 1,5—2 ч для омыления липидов. Затем приливают 3—5-кратное количество дистиллированной воды и экстрагируют неомыляемые вещества этиловым эфиром. Первая порция эфира должна быть в 4—5 раз больше объема обрабатываемого раствора. Последующие три-четыре порции эфира должны быть в 3 раза больше первой.

При исследовании растительных масел 50 г продукта омыляют в течение часа на кипящей водяной бане в присутствии 100 мл 25%-ного спиртового раствора КОН, затем раствор добавляют 10-кратным количеством дистиллированной воды и выделяют неомыляемые вещества многократной экстракцией этиловым эфиром.

Эфирный экстракт несколько раз промывают дистиллированной водой, первую порцию воды подкисляя, потом сушат над безводным Na_2SO_4 . Эфир отгоняют, остаток растворяют в бензоле и пропускают через колонку длиной 120—140 мм, заполненную окисью алюминия. Адсорбированные в колонке ПАУ, отделенные от других неомыляемых веществ, элюируют бензолом до тех пор, пока не прекратится выделение фракции с синей флуоресценцией. Бензол отгоняют из элюата, а остаток фракционируют колоночной или тонкослойной хроматографией.

Выделенную смесь ПАУ, содержащую некоторые примеси, растворяют в 10—15 мл петролейного эфира и наносят на заполненную окисью алюминия колонку диаметром 10—14 мм и высотой 120—140 мм. Элюируют флуоресцирующие фракции ПАУ сначала петролейным эфиром, затем с добавлением бензола. БП содержится в III, IV или V фракциях. Для более четкого отделения БП можно повторить фракционирование колоночным методом или в тонком слое окиси алюминия. При использовании второго метода растворителем служит смесь хлороформ-петролейный эфир (1:2).

Качественное определение БП проводят спектральным методом с использованием эффекта Э. В. Шпольского. При

температуре -196°C получают спектры люминесценции отдельных фракций ПАУ, растворенных в нормальных парафиновых углеводородах. Такие спектры имеют тонкую структуру и называются квазилинейчатыми. Для качественного определения БП используют смесь, состоящую из 1 мл бензольного экстракта и 2 мл н-октана. Пробирку со смесью помещают в сосуд Дьюара с жидким азотом. Возбуждают люминесценцию с помощью ртутно-кварцевой лампы ДРШ-250, ДРШ-50 или ПРК-2, пропуская УФ-излучение через фильтр УФС-1 или УФС-2. При определении только БП (если другие фракции ПАУ не интересуют) можно пользоваться также УФС-3 или УФС-4. Для записи спектра обычно используют спектрограф ИСП-51 с камерой $f=270$ мм. В спектре замороженного н-октанового раствора БП имеются характерные квазилинии 4030 и 4085 Å.

Количественное определение БП флуоресцентно-спектральным методом может быть выполнено с использованием любой из модификаций: с помощью добавок и установкой прибора по фону, создаваемому люминесцирующими примесями, которые содержатся в исследуемом экстракте [236], или с помощью внутреннего стандарта [65].

При определении БП с помощью первой из указанных модификаций исследуемый раствор сравнивают не с раствором чистого БП, а с таким же исследуемым, но сильно разбавленным раствором с добавлением в него определенного количества чистого БП (весовой излишек), на свечение которого также влияют посторонние вещества, как и в исследуемом растворе.

При определении БП с помощью внутреннего стандарта в бензпиреновую фракцию вводят чистое эталонное вещество, дающее хороший квазилинейчатый спектр в аналогичных условиях, причем в спектре этого вещества не должно быть линий, перекрывающихся с аналитическими линиями БП. Таким веществом-стандартом обычно служит 1,12-бензпериллен. В спектре Шпольского н-октанового раствора 1,12-бензпериллена есть четкая линия 4063 Å, располагающаяся между соответствующими линиями БП, а вблизи аналитических линий БП в спектре 1,12-бензпериллена заметные линии отсутствуют. Вещество-стандарт вводится для сравнения и в эталонные растворы БП. В исследуемом растворе измеряют отношение интенсивности линии БП и добавленного вещества. Пользуясь ранее определенным по растворам-«свидетелям» отношением интенсивности линий для известных концентраций БП и вещества-стандарта и зная количество добавленного стандарта, находят количество БП в бензпиреновой фракции, выделенной из продукта [136].

При уменьшении навески копченого продукта до 100 г, соблюдении указанных пропорций веществ, взятых для омыления липидов, и выполнении всех описанных этапов выделения, очистки и фракционирования ПАУ предел чувствительности метода составляет 0,1—0,2 мкг/кг. Погрешность опыта $\pm 10-15\%$ [66].

Определение пестицидов

Некоторые пестициды способны к собственной флуоресценции: варфалин, потозон, индолинуксусная кислота, нафтилацетат и др. Пестициды, не обладающие первичной люминесценцией (ДДТ, метоксифлор, альдрин, хлордан, гептахлор и др.), могут быть химическим путем переведены во флуоресцирующие соединения. Например, инсектицид 0,0-диэтил-0-нафтилимитиофосфат можно определить люминесцентным способом в концентрации 0,01 мкг/мл, предварительно окислив его во флуоресцирующее производное [151].

Для определения остаточного количества ядохимиката севина в хлопковом масле 100 мл продукта и такое же количество бутилового спирта помещают в делительную воронку. Энергично перемешивают содержимое воронки в течение 30 сек, затем приливают 25 мл 1 н. водного раствора NaOH и продолжают осторожно перемешивать еще 30 сек. После расслоения жидкостей сливают нижний водно-щелочной слой в пробирку и наблюдают люминесценцию в потоке ультрафиолетовых лучей. Зеленоватоголубое свечение раствора свидетельствует о присутствии севина.

При анализе свежих или сушеных овощей и плодов 100 г измельченного продукта помещают в колбу с притертой пробкой, заливают бензолом, перемешивают и оставляют на 30 мин. Затем к отфильтрованному бензольному экстракту в делительной воронке приливают 10—15 мл 0,1 н. водного раствора NaOH и перемешивают содержимое воронки в течение 30 сек. Наблюдают люминесценцию нижнего слоя.

Для количественного определения севина используют флуорометр ЭФ-3, снабженный светофильтром, как указано при определении витамина B₁ (см. стр. 167). Стандартный раствор содержит 50 мкг севина в 100 мл 0,1 н. водного раствора NaOH. Количество севина в продукте рассчитывают по ИЛ испытуемого и стандартного растворов [108].

Определение солей тяжелых металлов

С помощью люминесцентных реактивов можно определить содержание тяжелых металлов в пищевых продуктах. Обработка оксихинолином вызывает флуоресценцию меди, свинца, железа. В присутствии некоторых веществ люминесцируют растворы, содержащие соли олова, ртути [60].

При небольшой концентрации исследуемого вещества флуориметрический метод по чувствительности превосходит колориметрический, однако в связи с отсутствием хорошо разработанных методик ЛА пока не используется при определении тяжелых металлов в продуктах питания.

4.4. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ИНДИКАТОРЫ

Флуоресцентными индикаторами пользуются при титровании мутных или окрашенных растворов, например пива, вин, соков, растительных масел. Многие люминесцирующие органические вещества, обладающие кислотными или основными свойствами, могут быть применены в качестве рН-индикаторов, так как с изменением рН среды обычно изменяются и люминесцентные свойства. Известно до 40 рН-индикаторов [128], но они находят ограниченное применение, так как требуют дополнительных приспособлений: затемнения помещения, освещения титруемого раствора фильтрованными УФ-лучами. Возможно также искажение результатов наблюдения вследствие «тушения» флуоресценции индикатора веществами, присутствующими в титруемом растворе.

Более широкое распространение получают хемилюминесцентные индикаторы, свечение которых происходит не в результате превращения поглощенной световой энергии, как во всех видах фотолюминесценции, а за счет энергии, выделяемой при химических реакциях. Преимущество хемилюминесцентных индикаторов перед флуоресцентными состоит в том, что отпадает необходимость в источнике УФ-света.

Применение хемилюминесцентных рН-индикаторов основано на том, что свечение их возникает при определенном значении рН среды. Например, люминол начинает люминесцировать при рН 8,0—8,5, люцигенин — при рН 9,0—10,0 [60].

При определении кислотности в титруемый раствор добавляют 40 мг люминола, 30 мг гемоглобина и 6 мл 3%-ного раствора H_2O_2 , титруют 0,1 н. раствором NaOH до появления свечения, которое наблюдают визуально [18]. Можно применять люминол в сочетании с феррацианидом калия и перекисью водорода. К титруемому раствору добавляют 3 капли 0,1%-ного раствора H_2O_2 , 4 капли 5%-ного раствора $K_3Fe(CN)_6$ и 6 капель насыщенного водного раствора люминола. Конец титрования определяется по характерному свечению, которое продолжается не менее 30 сек.

* * *

Люминесценция наиболее широко используется для диагностики порчи продуктов питания, определения белков и жиров в молоке, витаминов группы В. Флуоресцентные методы незаменимы для обнаружения и количественного определения полициклических ароматических углеводородов.

5

РЕОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

5.1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ РЕОЛОГИИ

При оценке качества пищевых продуктов большое значение уделяется их консистенции. В последние два-три десятилетия наряду с условными, субъективными методами оценки консистенции все чаще применяются структурно-механические, или реологические, методы.

Реология — сравнительно молодая наука, сформировавшаяся как самостоятельная часть физико-химической механики. Она изучает течение и деформации различных веществ и материалов, широко используя при этом многие положения механики и теории упругости.

Все реальные тела способны деформироваться под воздействием внешних сил, т. е. изменять свою форму и размеры.

Под деформацией понимают относительное смещение частиц тела, при котором не нарушается его непрерывность. Деформация называется упругой, если она исчезает после снятия нагрузки, и остаточной, если после снятия нагрузки она сохраняется. Величина и характер деформации обусловлены свойствами материала тела, его формой и способом приложения внешних сил.

При деформировании тела возникают внутренние силы взаимодействия его отдельных частичек. Мету интенсивности этих внутренних сил называют **напряжением**.

После прекращения воздействия на тело внешних сил напряжения частично или полностью рассасываются вследствие теплового движения молекул и других элементов структуры. Процесс убывания напряжений во времени называется **релаксацией**. Время релаксации — важная структурно-механическая характеристика тела.

К реологическим свойствам тела относятся вязкость, упругость, эластичность и прочность.

Вязкость, или **внутреннее трение**, — свойство газов, жидкостей и твердых тел, обуславливающее сопротивление относительному перемещению слоев (течению под действием внешних сил). Для твердых тел — это сопротивление развитию остаточных деформаций.

Упругость — способность тел сопротивляться изменению их объема и формы под действием внешних сил, т. е. способность тела восстанавливать свою форму после снятия нагрузки.

Эластичность — способность материала при незначительных усилиях испытывать более или менее значительные упругие обратимые деформации без разрушения. Такой термин существует наряду с термином «упругость». Различие состоит в том, что упругость проявляется мгновенно, а эластичность — во времени.

Прочность — способность тела сопротивляться разрушению.

Наряду с указанными встречаются понятия **пластичность** — свойство тел необратимо деформироваться под действием нагрузки и **ползучесть** — частный случай пластической деформации под действием постоянной нагрузки.

Все законы реологии разработаны для идеальных тел.

Известны три основные модели идеальных тел: идеально упругое тело, или тело Гука, идеально пластичное тело Сен-Венана и идеально-вязкая, или ньютоновская, жидкость [216].

Идеально упругим называют тело, поведение которого под нагрузкой подчиняется закону Гука. Сущность этого закона состоит в том, что возникающая в теле линейная деформация пропорциональна приложенной нагрузке. Закон имеет математическое выражение:

$$P = E \cdot \epsilon, \quad (37)$$

где P — приложенное напряжение;

ϵ — линейная деформация (относительное изменение длины);

E — модуль упругости — величина, характеризующая способность материала сопротивляться деформации растяжения.

Особенностью идеально упругого тела является то, что после снятия нагрузки деформация исчезает, и оно полностью восстанавливает свою форму. Механической моделью идеально упругого тела может служить спиральная пружина.

Идеально пластичным считается тело, которое остается жестким до тех пор, пока величина приложенного напряжения лежит ниже некоторого критического значения, называемого пределом текучести (P_T). По достижении предела текучести происходит пластическое течение материала с постоянной скоростью при постоянном напряжении. Моделью идеально пластичного тела может быть некоторое тело, лежащее на плоскости, которое не начнет двигаться, пока напряжение сдвига не превысит некоторую предельную величину, после которой оно может двигаться практически с любой скоростью.

Реологическое уравнение для такого тела имеет вид: $P = P_T$, где P — касательное напряжение.

Идеально вязкой считается жидкость, течение которой подчиняется постулату Ньютона и закону Пуазейля. Вязкость такой жидкости не зависит от внешнего давления и градиента скорости и называется нормальной, бесструктурной, или ньютоновской.

В противном случае жидкость обладает аномальной, или структурной, вязкостью. Аномалии вязкости проявляются в ряде зависимостей: от концентрации, давления, температуры, механических воздействий и времени. Механической моделью вязкой жидкости может быть перфорированный поршень, перемещающийся в цилиндре с жидкостью. В такой модели напряжение пропорционально скорости сдвига:

$$P = \eta \cdot \gamma, \quad (38)$$

где η — коэффициент вязкости;

γ — скорость сдвига.

Ни один из реальных пищевых материалов не может быть полностью уподоблен ни одному из указанных идеальных тел. Чаще всего пищевые материалы соответствуют сложным моделям, представляющим собой комбинацию простых, т. е. являются или упруго-пластичными, или упруго-вязкими, или вязко-пластичными телами. Причем в зависимости от условий (температуры, влажности, давления, способа и скорости приложения нагрузки) то одни, то другие свойства проявляются в большей или меньшей степени. Поэтому при изучении реологических свойств обязательно должны быть четко указаны условия испытаний, в противном случае полученные результаты будут несопоставимы.

5.2. ТИПЫ СТРУКТУР И МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Многие пищевые массы, помимо твердого и жидкого состояний, образуют структуры, которые по физическим свойствам занимают промежуточное положение. К таковым относятся белковые и углеводные студни, суспензии с разной концентрацией (вплоть до паст), эмульсии и пены.

Наличие внутренней структуры придает таким системам определенные механические свойства — упругость, пластичность, вязкость, прочность, которые объективно характеризуют их консистенцию. Механические свойства зависят от природы входящих веществ и их соотношения, а также от сил взаимодействия между ними.

В соответствии с представлениями академика П. А. Ребиндера и его школы принято различать два основных типа дисперсных структур: коагуляционную и конденсационно-кристаллизационную.

Коагуляционные структуры удерживаются силами Ван-дер-Ваальса, действующими через жидкие прослойки. Основными условиями их образования являются неоднородность поверхности соприкосновения частиц и наличие гидрофобных участков, на которых возникают точечные контакты — начальные звенья будущей структуры.

Конденсационно-кристаллизационные структуры образуются в процессе конденсации полимеров или кристаллизации из растворов и расплавов; их существование определяется прочными химическими связями, отдельные частицы срастаются, жидкие прослойки между ними отсутствуют. Системы с такой структурой обладают большей прочностью, хрупкостью и необратимостью при разрушении.

Коагуляционные структуры могут переходить в конденсационно-кристаллизационные в процессе обработки продукта, когда создаются условия для удаления жидких прослоек между частицами, например при сушке или прессовании. Так как механические свойства любой системы теснейшим образом связаны с ее структурой, их часто называют структурно-механическими.

При изучении структурно-механических свойств пищевых материалов исследуется развитие деформаций во времени. В основном изучают два вида деформации: сжатие (растяжение) и сдвиг. В первом случае напряжение действует перпендикулярно поверхности образца, во втором — по касательной (тангенциально).

Результаты исследования структурно-механических свойств обычно выражают графически в виде кривых кинетики деформации. Для области неразрушенных структур существуют следующие два основных типа таких кривых.

1. Приложенное постоянное напряжение меньше предела текучести, т. е. выполняется условие $P < P_t$. Кривая представлена на рис. 23. На оси абсцисс отложено время (τ), на оси ординат — деформация (ϵ).

При мгновенном действии напряжения возникает упругая деформация ϵ_0 как мгновенная реакция тела на внешнее воздействие. Ее величина определяется силами первичных химических связей. Вслед за мгновенной, упругой развивается уже во времени высокоэластичная деформация, также обратимая по величине. Ее величина характеризует силу связи между отдельными макромолекулами и их звеньями.

Деформация достигает некоторого максимального значения ϵ_m и далее не меняется, так как действующее напряжение уравновешивается силами внутреннего сопротивления тела, конечный участок кривой является линейным. В точке С напряжение снимается ($P=0$), и деформация спадает до нуля по кривой DF , т. е. система полностью восстанавливает свою форму.

Для реальных пищевых масс и продуктов такой тип кривых встречается очень редко. Только некоторые пищевые студни при

действию малых напряжений могут давать полностью обратимые деформации.

2. Если выполняется условие $P > P_T$, то получается кривая, изображенная на рис. 24. После возникновения мгновенной упругой деформации ϵ_0 обнаруживается непрерывное нарастание остаточной деформации, переходящее в пластическое течение. Остаточная деформация нарастает с постоянной скоростью, которую можно охарактеризовать $\operatorname{tg} \alpha$.

Максимальная деформация ϵ_m за время действия нагрузки τ_1 определяется отрезком, отсекаемым на оси ординат касатель-

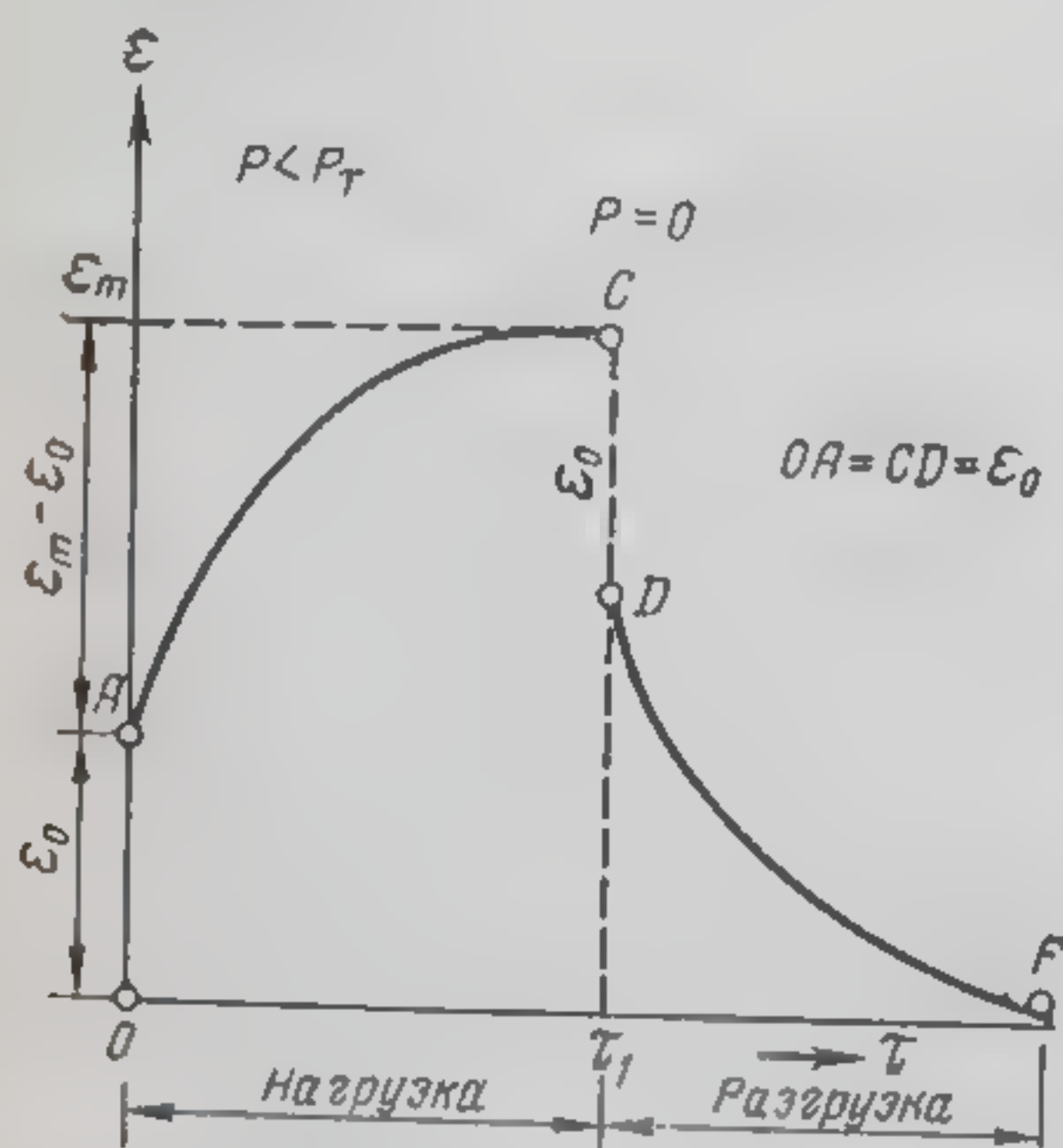


Рис. 23. Кривая кинетики деформации:

$$P = \text{const}; P < P_T$$

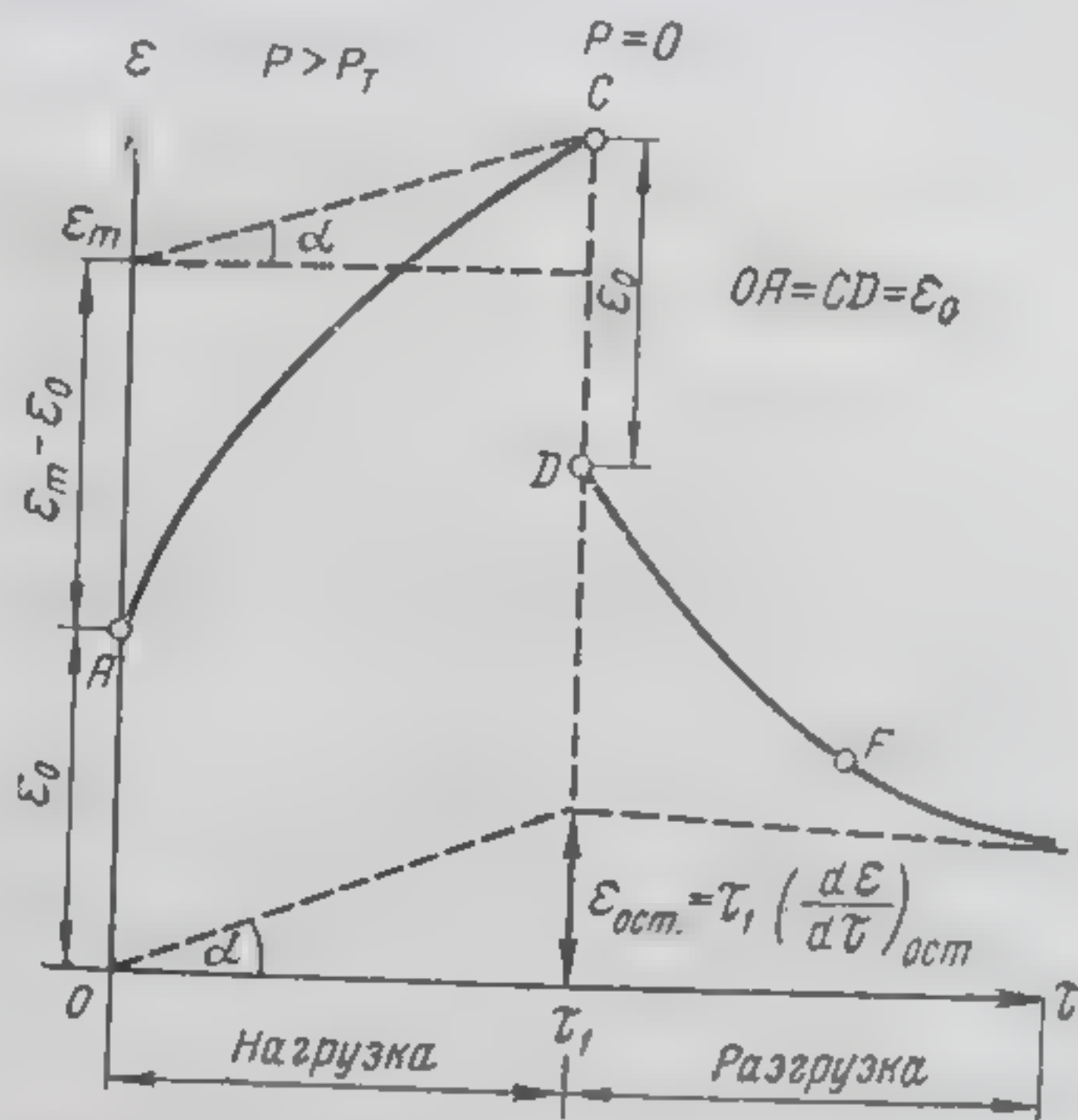


Рис. 24. Кривая кинетики деформации:

$$P = \text{const}; P > P_T$$

ной к конечному участку кривой. Ее величина, как видно на рис. 24, может быть найдена из равенства $\epsilon_m = \epsilon - \tau \left(\frac{d\epsilon}{d\tau} \right)_{\text{ост.}}$.

Разница $\epsilon_m - \epsilon_0 = \epsilon_0$ выражает величину эластической деформации.

В точке C напряжение снимают, происходит «отдых» образца, при этом исчезает упругая деформация $\epsilon_0 = OA = CD$, и идет восстановление эластической деформации. С увеличением времени кривая DF будет асимптотически приближаться к некоторому конечному значению деформации $\epsilon_{\text{ост.}}$, являющейся остаточной.

По кривой кинетики деформации, кроме предела упругости, характеризующегося напряжением, при котором кривая $\epsilon_0 = f(P)$ превращается из первого типа во второй, можно найти следующие независимые характеристики:

1. Модуль мгновенной упругости сдвига $E_1 = \frac{P}{\epsilon_0}$;

2. Модуль эластичности $E_2 = \frac{P}{\epsilon_m - \epsilon_0}$;

оба модуля имеют размерность напряжения, так как деформация в этом случае относительная, безразмерная величина.

3. Пластическую вязкость $\eta = P' / \left(\frac{d\varepsilon}{d\tau} \right)_{\text{ост.}}$, где $P' = P - P_T$ (для кривой первого типа предел упругости отсутствует, $P_T = 0$). Пластическую вязкость можно определить по разгрузочной части кривой из соотношения

$$\eta_{\text{пл.}} = P' / \frac{\varepsilon_{\text{ост.}}}{\tau_1},$$

где τ_1 — время действия нагрузки.

4. Условную вязкость $\eta_{\text{усл.}} = \frac{P}{\left(\frac{d\varepsilon}{d\tau} \right)_0 - \left(\frac{d\varepsilon}{d\tau} \right)_{\text{ост.}}}$,

где $\left(\frac{d\varepsilon}{d\tau} \right)_0$ определяется наклоном касательной начального участка кривой, а $\left(\frac{d\varepsilon}{d\tau} \right)_{\text{ост.}}$ — наклоном касательной конечного участка кривой к оси абсцисс.

Так как упругость — свойство, проявляющееся мгновенно, модуль, вычисленный по величине упругой деформации, называется условно-мгновенным модулем упругости.

Помимо указанных независимых значений E_1 , E_2 , $\eta_{\text{пл.}}$, $\eta_{\text{усл.}}$ структурно-механические свойства пищевых продуктов и полуфабрикатов могут быть охарактеризованы некоторыми относительными величинами. Такие величины были предложены академиком П. А. Ребиндером для структурированных дисперсных систем и растворов высокомолекулярных соединений: упругость

$$U\% = \frac{\varepsilon_0}{\varepsilon_m} 100; \text{ пластичность } P\% = \frac{\varepsilon_{\text{ост.}}}{\varepsilon_m} 100; \text{ эластичность } \mathcal{E}\% = \frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_0}{\varepsilon_m} 100 \text{ или } \mathcal{E} = \frac{E_1}{E_1 + E_2}.$$

Все перечисленные характеристики можно получить, используя описываемые ниже приборы.

5.3. ПРИБОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСНОВНЫХ РЕОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

При исследовании структурно-механических свойств измеряемыми величинами являются: действующее напряжение — P ; деформация — ε ; скорость деформации — V . Одна из них обычно является постоянной, две другие измеряются одна в зависимости от другой. Например, при $P = \text{const}$ измеряется зависимость деформации от времени: $\varepsilon = f(\tau)$.

Величину рабочего напряжения всегда подбирают в зависимости от цели исследования, учитывая, что при малых напряжениях трудно определить упруго-эластичные свойства системы, а при больших — ее вязкость.

Время действия нагрузки также подбирается в каждом отдельном случае, но всегда так, чтобы дать полностью развиться деформациям.

Приборы, предназначенные для исследования структурно-механических свойств, группируются по типу измеряемых деформаций, например приборы для измерения деформации сдвига, деформации одноосного сжатия и т. д.

5.3.1. ПРИБОРЫ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ДЕФОРМАЦИИ СДВИГА

В зависимости от формы пространства (зазора), в котором производится деформирование, все приборы этого типа подразделяют на три группы: приборы с плоскопараллельным зазором (Вейлера — Ребиндера, Николаева); приборы с кольцевым, коаксиальным зазором (ротационные вискозиметры); приборы с зазором в виде капилляра или узкой трубки (капиллярные и шариковые вискозиметры).

Прибор Вейлера—Ребиндера

Этот прибор предназначен для изучения механической прочности систем с самой различной структурой: суспензий, паст, студней. Одной из основных характеристик механической прочности является предельное напряжения сдвига — P .

С помощью указанного прибора предельное напряжение сдвига определяют по усилию, необходимому для вырывания (сдвига) пластинки, помещенной в исследуемую систему.

Прибор существует в двух модификациях, представленных на рис. 25. В первой модификации (рис. 25, а) под действием груза движется пластинка, во второй (рис. 25, б) — кювета помещена на подвижный столик, который с помощью электромотора может равномерно опускаться со скоростью примерно 1 см/мин. Усилие, необходимое для сдвига пластинки, определяют по растяжению предварительно откалиброванной пружины.

Методика измерения. Кювету заполняют исследуемой системой и в предварительном испытании подбирают груз таким образом, чтобы происходило медленное вытягивание пластины, причем величина деформации должна укладываться в размеры шкалы.

Кювету промывают водой, устанавливают в ее средней части пластину и вновь заполняют исследуемой системой. Измерения начинают примерно через 30 мин, прибор и секундомер включают одновременно, груз начинает сдвигать пластину. Деформацию сдвига во времени наблюдают в микроскоп и записывают. По результатам измерений строятся кривая кинетики деформации.

Прибор довольно чувствителен и дает возможность определять следующие величины:

1. Предельное напряжение сдвига:

$$P = \frac{F_m - F}{2S}, \quad (39)$$

где P — предельное напряжение сдвига, $г/см^2$ ($кг/м^2$);
 F_m — усилие, необходимое для сдвига пластины в системе, $г$ ($кг$);
 F — усилие, необходимое для сдвига пластины в дисперсионной среде (в воде, если это водная суспензия), $г$ ($кг$);
 S — площадь пластины, $см^2$ ($м^2$).

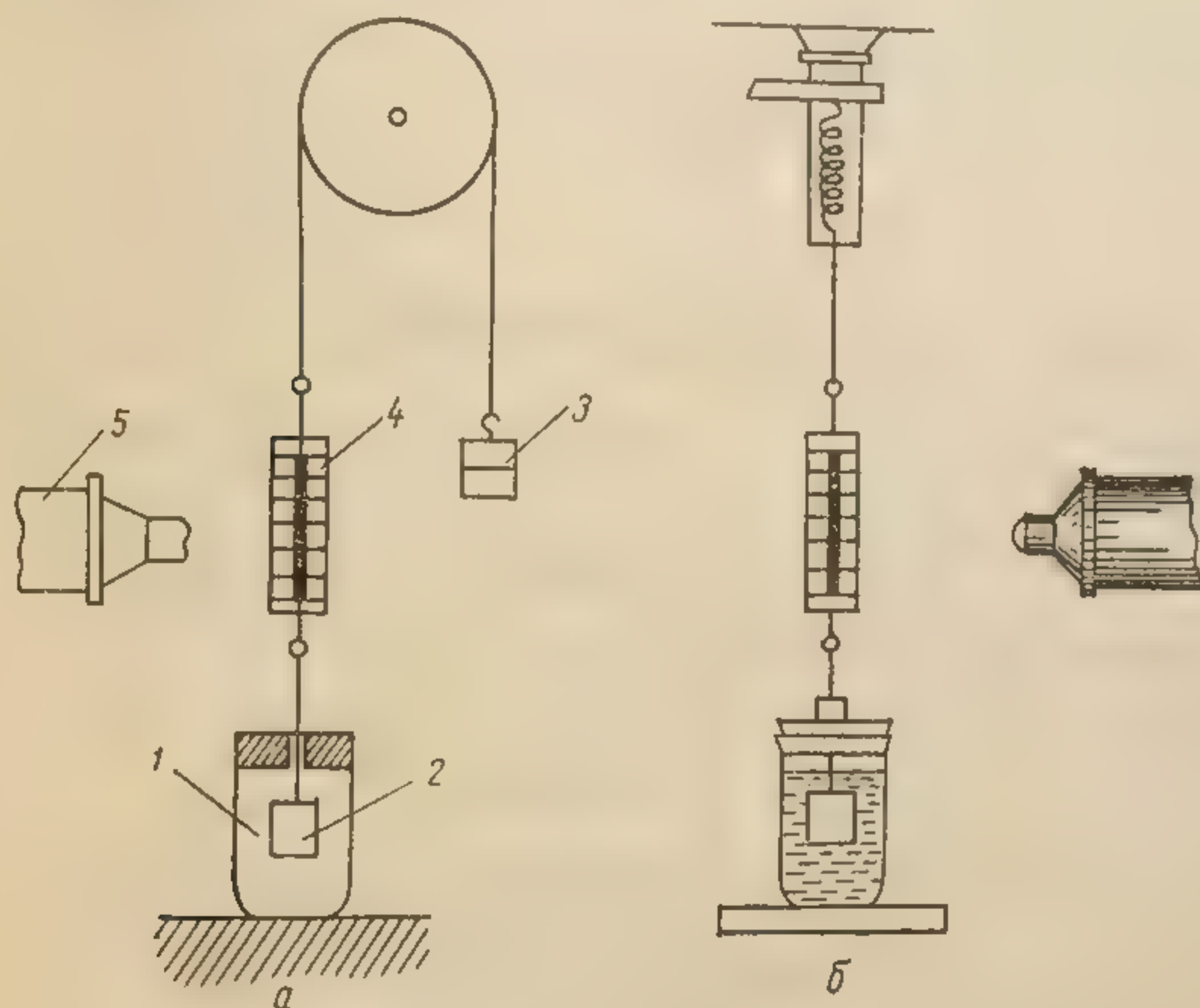


Рис. 25. Схема прибора Вейлера—Ребиндера в двух (а и б) модификациях:

1 — плоскопараллельная кювета; 2 — пластинка; 3 — съемный груз; 4 — микрошкала; 5 — микроскоп

2. Модуль сдвига:

$$E_c = \frac{P}{\varepsilon}, \quad (40)$$

где P — напряжение, $г/см^2$ ($кг/м^2$);
 ε — отношение деформации сдвига к ширине зазора между пластинкой и стенками кюветы.

3. Эффективную вязкость:

$$\eta_{эф.} = \frac{P}{D}, \quad (41)$$

где \bar{D} — скорость сдвига (сек^{-1}), равная $\frac{V}{\Delta h}$ (V — скорость перемещения пластины, см/сек (м/сек); h — ширина зазора между стенкой кюветы и пластинкой, см).

Величина предельного напряжения сдвига не зависит от размеров пластинки.

Прибор Вейлера — Ребиндера широко используется в пищевой промышленности для определения прочности различных пищевых масс, влияния температуры и добавок на прочность, а также для установления ряда других характеристик, необходимых для улучшения консистенции продукта и совершенствования технологического процесса производства.

Исследованием реологических свойств сахаряблочного и сахаропектинового студней была найдена оптимальная дозировка сахара для получения требуемой консистенции кондитерских изделий. В качестве критерия «жесткости» системы был взят условно-мгновенный модуль упругости.

По величине предельного напряжения сдвига была определена прочность крахмального клейстера в зависимости от концентрации и механических воздействий [94].

Величина предельного напряжения сдвига и вид кривых кинетики деформации послужили основанием для нахождения оптимального времени перемешивания пралиновых масс при производстве конфет [125].

Изучение кривых кинетики деформации раствора амилозы, амилопектина и клейстеризованного крахмала в зависимости от времени их «старения» позволило внести вклад в исследование ретроградации крахмала [115].

По кривым зависимости деформации от напряжения сдвига установили, что болгарская томатная паста является структурированной системой [97]. Для нее изучена зависимость структурно-механических свойств от концентрации, тепловой обработки и сорта сырья.

Прибор Николаева для измерения деформации сдвига на наклонной плоскости

Прибор [149] создан на основе известной модели Д. М. Толстого и отличается от нее тем, что оптический метод регистрации напряжений заменен механическим (рис. 26).

Методика измерения. Плоскость основания приводят в горизонтальное положение. На опущенную площадку 8 шпателем намазывают исследуемый продукт и формируют его в виде пластины размером $4 \times 4 \times 0,5$ см; при такой толщине образец доходит до уровня плоскости 2. На образец помещают рифленую алюминиевую пластинку 12, которую вплотную подводят к нижнему концу измерительной стрелки. Сверху на пластинку 12 кладут съемный груз.

Нажимая кнопку 9, поднимают образец на уровень плоскости 2, проверяют, не сдвинулась ли при этом измерительная стрелка нулевого положения (если сдвинулась, то ее подводят к нулю). Выдержав образец в таком положении примерно 1 мин, отжимают головку 4 упорного штифта и поднимают конец плоскости 2 до угла наклона в $10-15^\circ$ по шкале 3. Закрепляют наклонную плоскость и одновременно включают секундомер; записывают величину деформации во времени, указываемую стрелкой на шкале 6.

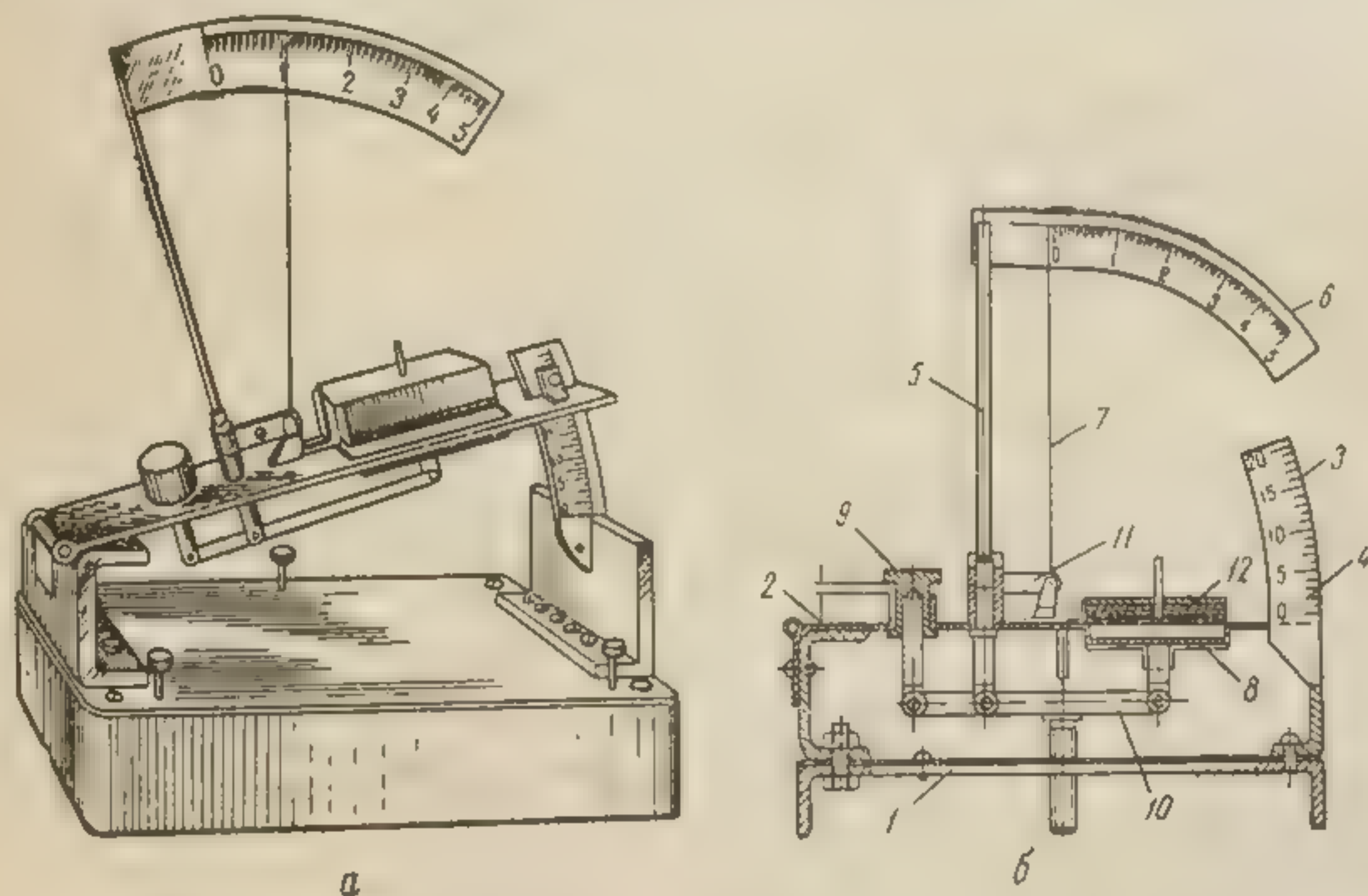


Рис. 26. Прибор Николаева для измерения деформации сдвига на наклонной плоскости:

а — общий вид; б — схема: 1 — основание; 2 — плоскость, которую можно установить под углом от 0 до 15° ; 3 — шкала для установления плоскости под определенным углом; 4 — штифт, закрепляющий шкалу; 5 — стойка измерительной шкалы; 6 — измерительная шкала; 7 — стрелка; 8 — площадка для помещения образца; 9 — кнопка левого плеча рычажного механизма; 10 — шток правого плеча рычажного механизма; 11 — регулировочный винт кронштейна; 12 — нагрузочная пластинка

Закончив изучение деформации при нагрузке, снимают нагрузочные пластинки, освобождают штифт 4 и переводят плоскость в горизонтальное положение. Наблюдают по шкале и записывают обратное движение стрелки, происходящее благодаря силам упругого последствия структуры.

Прибор позволяет измерять деформации в пределах 5 мм. При толщине образца 5 мм и максимальной скорости деформации 1 мм/мин градиент скорости деформации составляет $0,003 \text{ сек}^{-1}$ (градиент скорости вычисляется как отношение линейной скорости деформации к толщине образца).

Указанным прибором можно исследовать системы с вязкостью 10^2-10^5 пуаз ($1 \text{ пуаз} = 0,1 \text{ Н} \cdot \text{сек}/\text{м}^2$). Модифицированный вариант этого прибора позволяет производить измерения для систем с вязкостью $10^6-10^8 \text{ Н} \cdot \text{сек}/\text{м}^2$. Расхождения между параллельными определениями деформаций $10-15\%$.

Модуль сдвига и вязкость системы рассчитывают по уравнениям:

$$E = \frac{P \cdot \sin \alpha \cdot 981 \cdot l \delta}{\epsilon_{уэ.}} ; \quad \eta = \frac{P \cdot \sin \alpha \cdot 981 \cdot l \cdot \tau \cdot \delta}{\epsilon_{ост.}}, \quad (42)$$

где α — угол наклона плоскости, для $\alpha = 15^\circ$ синус равен $\sim 0,26$;
 l — толщина пластины образца, см (м);
 $\epsilon_{уэ.}$ и $\epsilon_{ост.}$ — соответственно упруго-эластичная и остаточная деформация;
 981 — ускорение силы тяжести;
 τ — время деформирования, сек;
 P — напряжение (получается делением общего веса покровной и нагрузочных пластин на площадь пластины), г/см² (кг/м²);
 E — модуль сдвига, дин/см² (кг/м²);
 η — вязкость, пуаз (Н·сек/м²);
 δ — деформация в единицах шкалы прибора.

Величину упруго-эластичной и остаточной деформации находят по кривой кинетики деформации.

Приборы Николаева и Толстого широко применяют для исследования структуры и консистенции пищевых продуктов. На приборе Толстого по величине условно-мгновенного модуля упругости и вязкости, а также вычисленной затем эластичности определяли консистенцию маргарина, полученного с применением сухого молока [95]. Эти же характеристики использовали для исследования изменений в структуре и консистенции маргарина в процессе хранения [96].

По величине модуля эластичности устанавливают зависимость консистенции пралиновых масс от температуры [57].

Для характеристики структурно-механических свойств студней желатина по величине модуля сдвига и ползучести рекомендуют [25] использовать прибор Толстого взамен введенного в ГОСТ прибора Валента, дающего показания в относительных единицах.

С помощью прибора Николаева исследовалась динамика структурообразования фруктово-желейной конфетной массы.

Прибор неоднократно применялся для исследования упруго-вязких характеристик хлебного теста и влияния на них механической обработки, содержания белков, клейковины, крахмала и отрубей.

На основании измерения вязкости мясного фарша были подобраны оптимальные условия предварительной обработки мяса, предназначенного для производства вареных колбас.

Приборы с плоскопараллельным зазором просты в обращении, не требуют громоздких вычислений и обладают значительной чувствительностью. Недостатком их является то, что шкала измерений деформации сдвига ограничена всего несколькими

миллиметрами, поэтому с помощью этих приборов нельзя измерять большие деформации. Для измерения значительных деформаций используют приборы с кольцевым зазором — ротационные вискозиметры.

Ротационный вискозиметр Воларовича

Существует множество моделей ротационных вискозиметров, предназначенных для изучения кривых течения (кривая, отражающая зависимость градиента скорости от напряжения сдвига) жидких и жидкообразных систем.

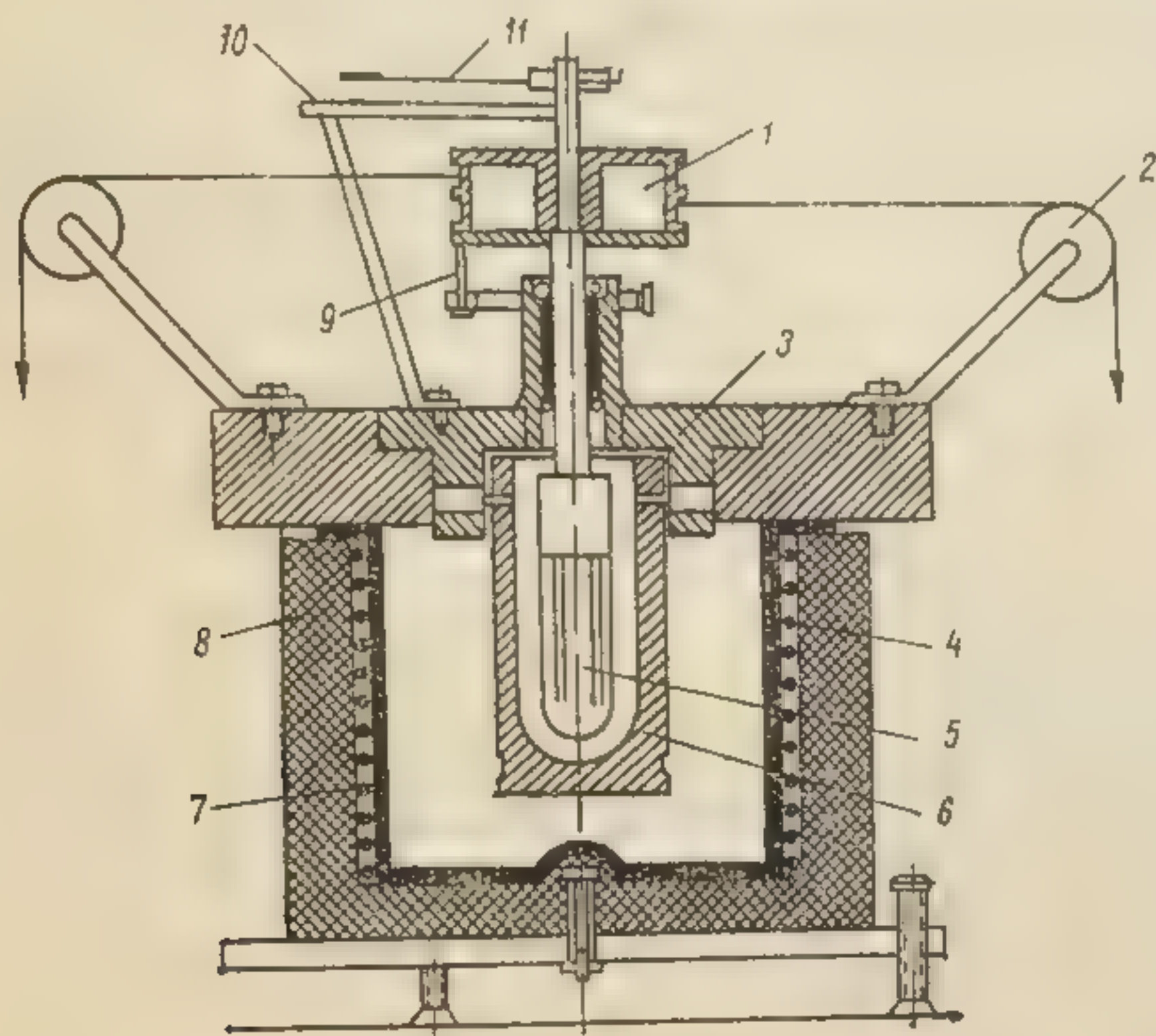


Рис. 27. Схема ротационного вискозиметра РВ-8 системы Воларовича:

1 — шкив; 2 — блоки; 3 — установочная гайка; 4 — стакан для термостатирующей жидкости; 5 — ротор; 6 — стакан; 7 — спираль электронагрева; 8 — изоляция; 9 — стопор; 10 — шкала; 11 — стрелка

Принцип действия ротационного вискозиметра (рис. 27) заключается в следующем. Исследуемая масса помещается в зазор между двумя соосными (коаксиальными) цилиндрами и при вращении одного из них (иногда подвижным является внутренний цилиндр, иногда — внешний) вязкая жидкость, прилипшая к стенкам цилиндров, вовлекается в движение, создавая ему препятствие. При этом можно измерить либо усилие, которое требуется приложить для продолжения вращения, либо величину, характеризующую скорость движения.

Методика измерения. Перед началом измерений обычно делается «холостой» опыт, целью которого является определение собственного трения цилиндра, блоков и нити. К нитям подве-

шивают сначала грузы по 1 г, затем по 1,5 и по 2,0 г (для хорошего прибора не более 2,5 г), до тех пор пока цилиндр не начнет вращаться. Наименьшая сила P_0 , вызывающая вращение, будет равна силе трения системы.

Для определения предельного напряжения сдвига внешний цилиндр загружают исследуемым веществом в таком количестве, чтобы глубина погружения внутреннего цилиндра составляла 7—8 см (можно загружать по весу). Если измеряемая система является пастой или высоковязкой жидкостью, то необходимо следить, чтобы не оставалось пустот и пузырей воздуха.

Загрузив цилиндр, подвешивают к обеим нитям прибора начальный груз (обычно начинают с груза P_0), освобождают тормоз и следят за вращением цилиндра. Если под действием приложенного вращающего момента цилиндр не сдвигается, то груз увеличивают до тех пор, пока цилиндр не начнет вращаться. За вращение принимают безостановочный поворот не менее чем на $1/4$ окружности. Если наименьшим является груз, вызывающий вращение P_1 , то предельное напряжение сдвига вычисляют по формуле

$$P_m = K(P_1 - P_0), \quad (43)$$

где K — константа прибора, зависящая от глубины погружения внутреннего цилиндра. Обычно таблица со значениями K прилагается к прибору вместе с инструкцией по его эксплуатации.

После определения предельного напряжения сдвига увеличивают груз, подвешенный к нитям, и определяют скорость вращения цилиндра при двух или трех значениях грузов, измеряя секундомером время трех-четырех оборотов при каждой нагрузке.

Для неньютоновских жидкостей требуется время для установления стационарного потока при каждой нагрузке (при стационарном потоке скорость вращения внутреннего цилиндра не зависит от времени). Обычно стационарный поток устанавливается уже после первых двух оборотов, поэтому при каждой нагрузке первые два оборота пропускают и определяют время следующих двух-трех оборотов. Время одного оборота должно быть от 20 до 15 сек. Если оно мало, то определяют время пяти—семи оборотов, если велико, то можно измерить часть оборота, но не менее чем для 90° .

Вязкость вычисляют по уравнению

$$\eta = K_1 \frac{P - P_0}{N}, \quad (44)$$

где N — число оборотов в секунду;

K_1 — константа прибора, зависящая от глубины погружения.

Для характеристики вязкостных свойств неньютоновских жидкостей принято графически изображать зависимость между напряжением сдвига и градиентом скорости. Обе эти величины непосредственно измерить нельзя, их находят расчетным путем.

Градиент скорости определяют как отношение скорости вращения цилиндра (число оборотов в секунду) к величине зазора между цилиндрами (дается в инструкции к прибору).

На практике кривые течения часто строят в координатах: угловая скорость вращения внутреннего цилиндра-груз, вызываю-

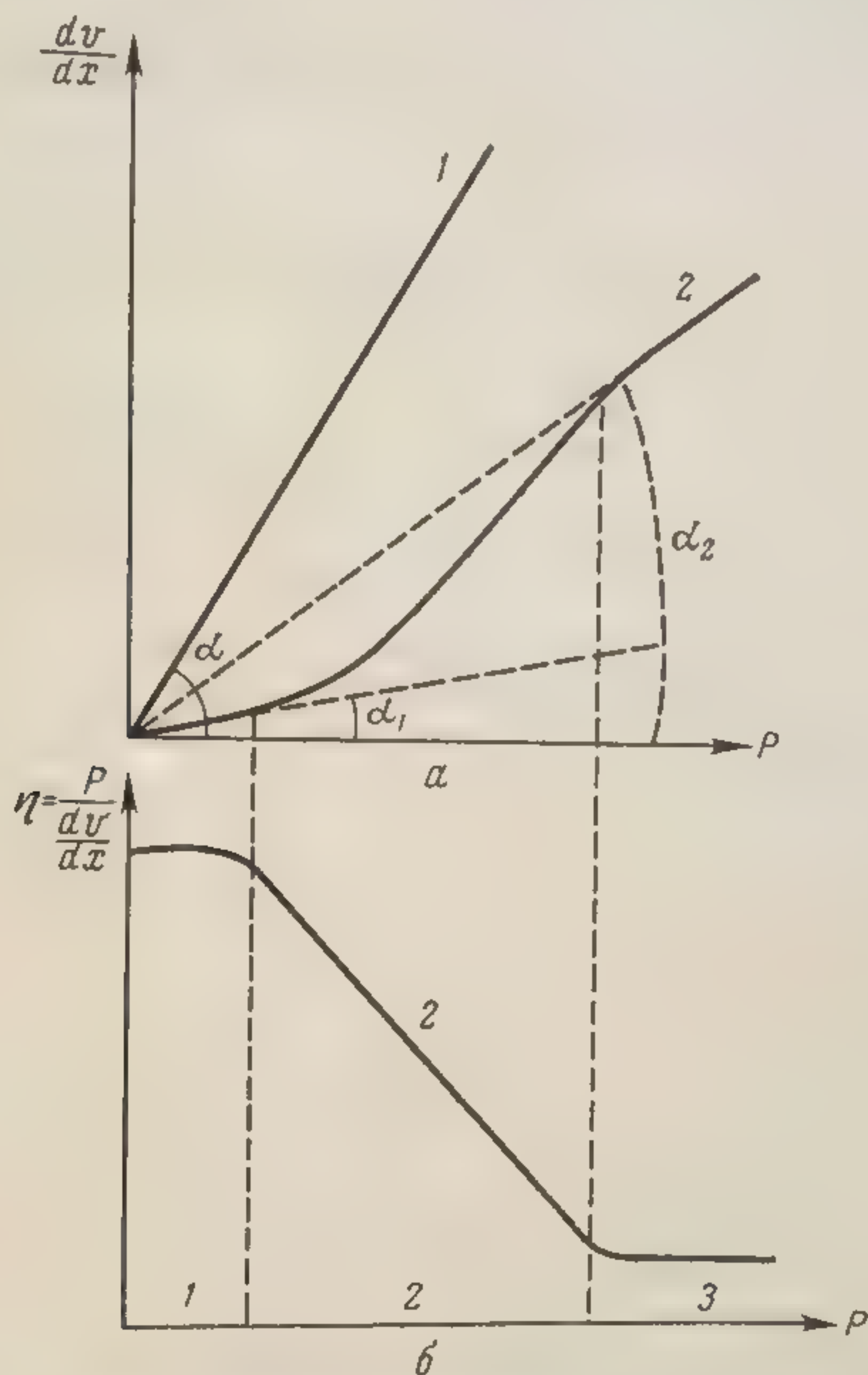


Рис. 28. Кривые течения (а) для ньютоновской (1) и структурированной (2) жидкостей и зависимость вязкости от напряжения сдвига для структурированной жидкости (б)

щий вращение. Эти величины пропорциональны градиенту скорости и напряжению сдвига, но в отличие от них могут быть определены опытным путем.

Определение вязкостных характеристик возможно только в условиях стационарного ламинарного потока, в противном случае результаты измерений будут носить случайный характер.

Для истинных растворов при постоянном напряжении сдвига отвечающий ему градиент скорости устанавливается практически мгновенно и далее не меняется во времени. Для пищевых

масс, являющихся сложными дисперсными системами, этот процесс требует некоторого времени, что обусловлено разрушением внутренней структуры деформацией и ориентацией частиц или макромолекул вдоль потока.

Кривые течения, полученные с помощью ротационного вискозиметра, позволяют отнести исследованные жидкости к ньютоновским или к структурированным, аномально вязким.

Для ньютоновской жидкости кривая течения представляет собой прямую, выходящую из начала координат (рис. 28, а). Вязкость такой системы можно вычислить графически, как котангенс угла наклона прямой к оси абсцисс ($\text{ctg } \alpha$). Значение ее является величиной постоянной при данной температуре в широком интервале напряжений сдвига.

На рис. 28, б представлен характерный вид кривой течения для структурированной жидкости, здесь отчетливо выделяются три области (отмечены цифрами). При очень малых (1) и очень больших (3) напряжениях наблюдается линейная зависимость, жидкость течет, как ньютоновская, и ее вязкость определяется котангенсом соответственно углов α_1 и α_2 . В области средних напряжений (2) происходит отклонение от линейности. Здесь вязкость не остается величиной постоянной, а падает с ростом градиента скорости или напряжения сдвига. В отличие от ньютоновской ее называют эффективной и определяют из соотношения

$$\eta_{\text{эф.}} = P / \frac{dv}{dx}. \quad (45)$$

Общего аналитического выражения для кривых течения структурированных жидкостей нет, в определенных условиях некоторые из них могут быть описаны уравнением Бингама:

$$P - \theta = \gamma \cdot \frac{dv}{dx}. \quad (46)$$

Две константы этого уравнения θ и γ имеют размерность соответственно напряжения сдвига и вязкости.

Если обратиться к кривой течения бингамовской жидкости (рис. 29), то окажется, что течение может начаться только тогда, когда приложенное напряжение превысит величину θ . Поэтому данную константу часто называют предельным напряжением сдвига π (может не совсем обоснованно) используют для характеристики прочности системы. Бингамовская вязкость (в отличие от уменьшающейся $\eta_{\text{эф.}}$) остается постоянной и определяется из соотношения

$$\gamma = P - \theta / \frac{dv}{dx}. \quad (47)$$

Реальных систем, которые бы строго следовали уравнению Бингама нет, но оно хорошо отражает течение жидкостей для некоторых средних значений напряжения сдвига.

В пищевой промышленности используют ротационные вискозиметры системы Павлова, Мачихина и ряд других [51]. Однако большинство исследований выполняется на вискозиметрах системы Воларовича: РВ-4, РВ-7 (включен в ГОСТ) и РВ-8.

С целью улучшения технологического процесса получения пшеничного теста изучалась зависимость вязкости и предельного напряжения сдвига от влажности [208].

По основным реологическим свойствам теста исследовался процесс формования бараночных изделий [135].

В консервной промышленности по виду реологических кривых, построенных в координатах скорость сдвига — напряжение

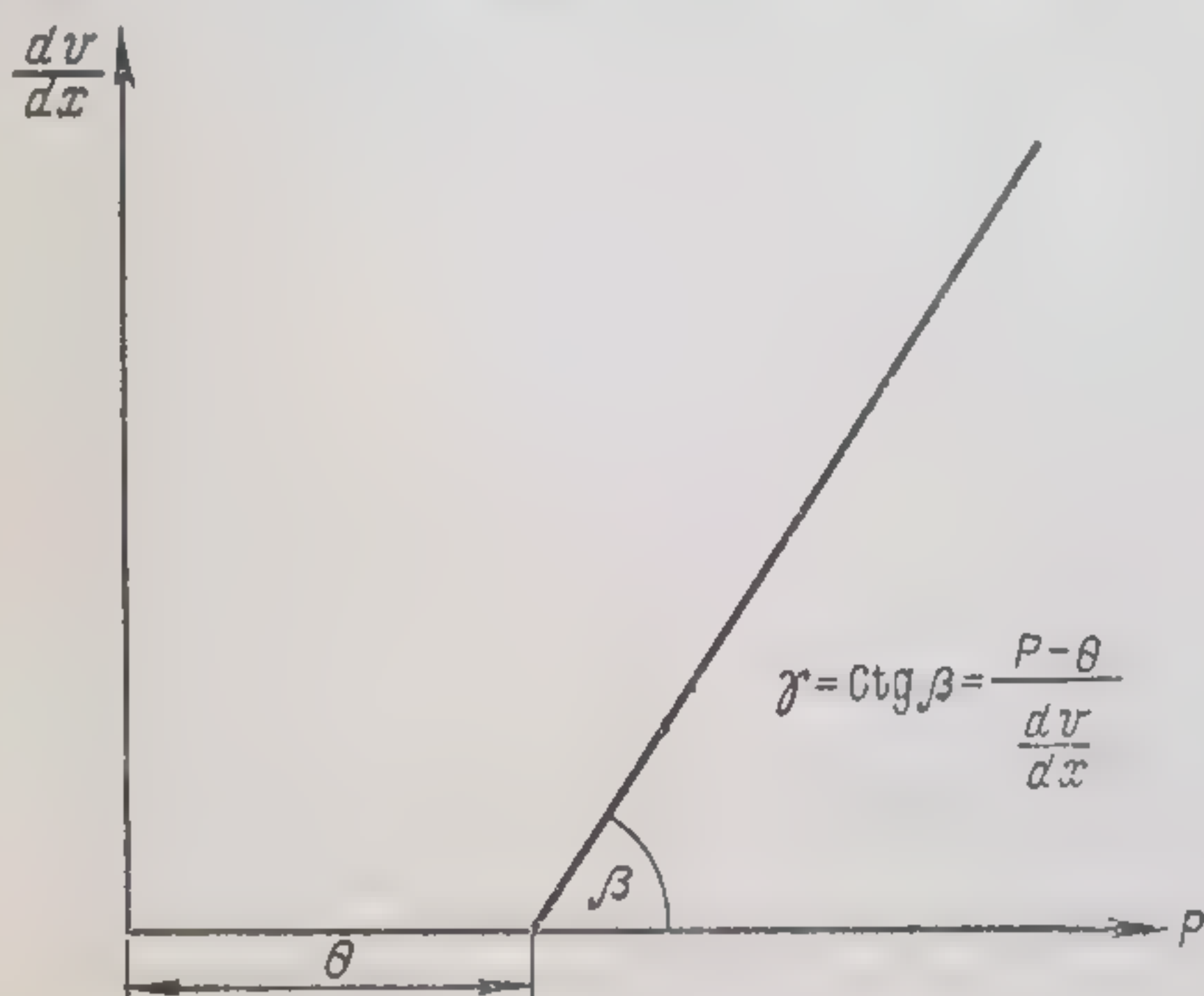


Рис. 29. Кривая течения бингамовской жидкости

сдвига, была сделана попытка классифицировать многочисленные структуры жидких и пюреобразных готовых продуктов и полуфабрикатов [17].

В кондитерской промышленности неоднократно исследовались структурно-механические свойства масс пралине. Для массы «Чародейка» изучена зависимость эффективной вязкости массы от содержания жира, температуры и скорости сдвига [24]. Для усовершенствования технологического процесса формования корпусов пралиновых конфет изучалась зависимость напряжения сдвига от скорости сдвига при различных температурах [1].

Интересным реологическим телом является сливочная помадка. Исследуя кривые течения (на ротационном вискозиметре Мачихина), установили, что ее можно отнести к структурированным жидкостям, так как вязкость зависит от скорости сдвига [90].

Изучение взаимосвязи адгезионных и структурно-механических свойств (также по величине предельного напряжения сдвига) позволило сделать вывод, что формование корпусов

конфет из помадных масс без разрушения внутренней структуры можно производить при любой температуре, если подобрать соответствующие напряжение и скорость сдвига [132].

Определяя эффективную вязкость молочных конфет, подбирали условия для получения массы типа «Коровка» и исследовали влияние времени уваривания на ее вязкость [79].

Зависимость величины эффективной вязкости от градиента скорости была положена в основу исследования реологических свойств рахат-лукума (сахарокрахмальный студень) — [37].

Кроме того, на вискозиметре РВ-8 были исследованы реологические свойства желатина с целью определения качества и сортности [13] мясного фарша [46] и других продуктов.

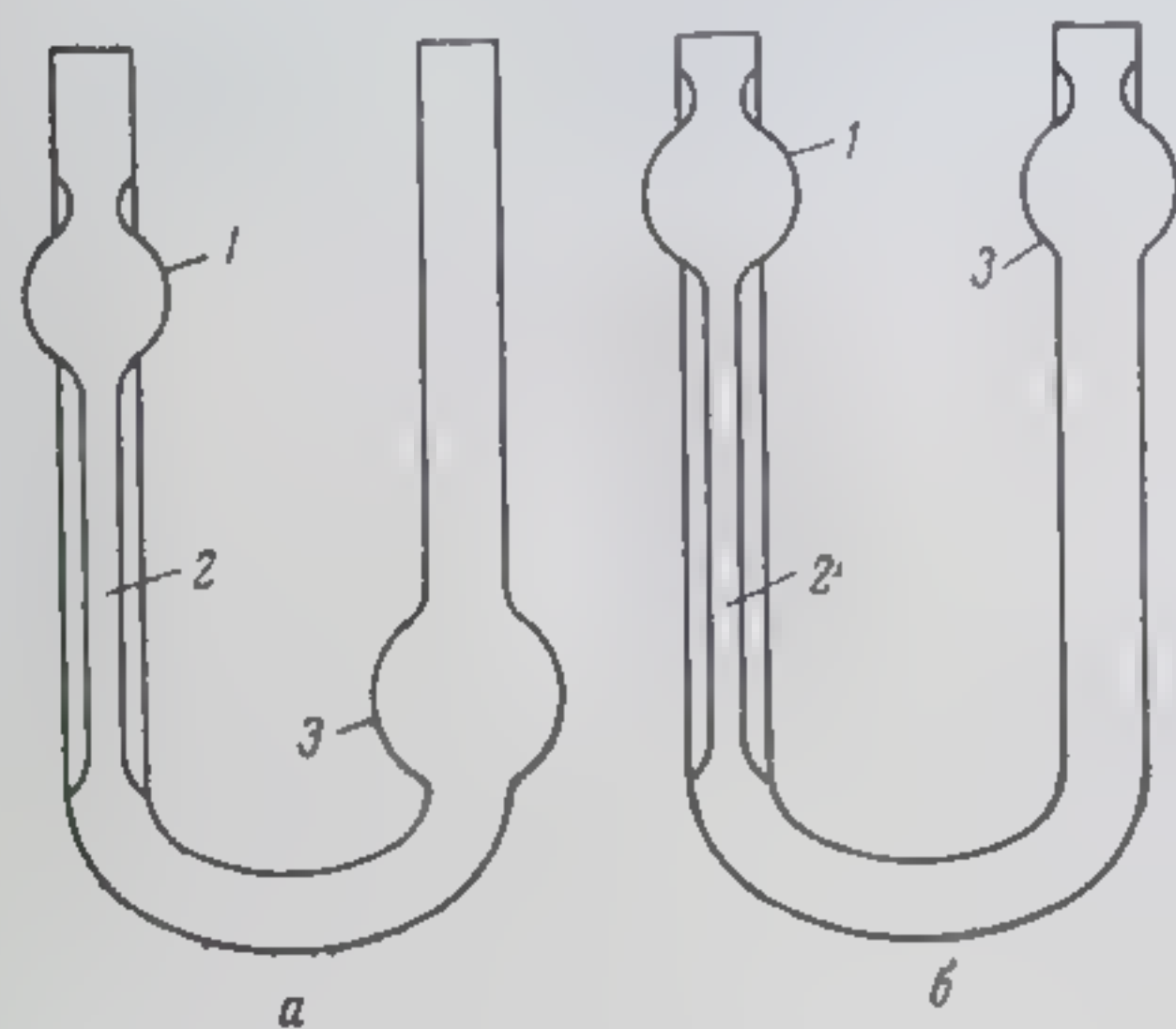


Рис. 30. Капиллярные вискозиметры:

a — Оствальда; *б* — Убеллоде; 1 — емкость для исследуемой жидкости; 2 — капилляр; 3 — емкость для собирания жидкости после измерения

Капиллярные вискозиметры

Эти приборы применяются для исследования систем, обладающих низкой вязкостью. На рис. 30 представлены два типа капиллярных вискозиметров, которые чаще всего используются: вискозиметр Оствальда и вискозиметр Убеллоде.

Вискозиметр Оствальда отличается от вискозиметра Убеллоде

тем, что в нем течение жидкости через капилляр происходит под действием собственного веса. В вискозиметре же Убеллоде для течения жидкости в одном из колен создается давление или разрежение. При пользовании тем и другим прибором измеряемой величиной является время истечения через капилляр определенного объема жидкости. Обычно вязкость определяется по отношению к известному значению вязкости какой-либо эталонной жидкости: воды, касторового масла, глицерина и др.

Методика измерения. При использовании вискозиметра Оствальда предварительно подбирают объем исследуемой жидкости таким образом, чтобы после заполнения левого колена до верхней метки в нижней части шарика 3 едва выступал мениск жидкости.

В правое колено хорошо вымытого и высушенного вискозиметра пипеткой заливают ранее определенное количество исследуемой жидкости, помещают прибор в термостат и укрепляют строго вертикально. Жидкость термостатируют 20—25 мин, после чего с помощью резиновой трубочки ее засасывают в левое колено так, чтобы мениск на 2—3 мм был выше верхней метки, и дают свободно стекать через капилляр. Когда мениск

будет на уровне метки, включают секундомер и измеряют время прохождения жидкости между метками. Измерения повторяют трижды и берут среднее значение. Время истечения стандартной жидкости в тех же условиях обычно определяют заранее. Вязкость вычисляют по уравнению Пуазейля:

$$Q = \frac{\pi \cdot P \cdot r^4 \cdot \tau}{8l\eta}, \quad (48)$$

где Q — объем вытекающей жидкости;
 P — внешнее давление;
 r — радиус капилляра;
 τ — время истечения;
 l — длина капилляра;
 η — вязкость.

Вязкости двух жидкостей (стандартной и исследуемой), измеренные при прочих равных условиях в одном капилляре, будут относиться как $\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{\tau \cdot d}{\tau_0 \cdot d_0}$, откуда вязкость исследуемой жидкости может быть определена как

$$\eta = \eta_0 \frac{\tau \cdot d}{\tau_0 \cdot d_0}, \quad (49)$$

где η_0 и η — вязкость стандартной и исследуемой жидкостей, *пуаз* ($H \cdot \text{сек}/m^2$);
 d_0 и d — плотность стандартной и исследуемой жидкостей, $г/см^3$ ($кг/м^3$);
 τ_0 и τ — время истечения стандартной и исследуемой жидкостей, *сек*.

С помощью капиллярного вискозиметра изучалась зависимость вязкости от температуры для мясо-костного бульона и технической дефибрированной крови [45], а также вязкость некоторых натуральных соков, например виноградного [17].

Шариковый вискозиметр Гепплера

Прибор изображен на рис. 31. С помощью подставки 10 и установочного винта 11 вискозиметр вместе с термостатирующей рубашкой может быть перевернут (для повторения измерения) и башкой может быть перевернут (для повторения измерения) и наклонен под углом 10° , чтобы избежать отклонения пути падения шарика от прямого. Прибор обычно снабжен шестью различными стандартными шариками, характеристики которых прилагаются.

Методика измерения. Исследуемую жидкость переносят в трубку так, чтобы в ней не было пузырьков воздуха. Термостатируют при заданной температуре примерно 30 мин и наклоняют

няют вискозиметр на 10° , давая шарiku свободно падать в жидкости. Как только шарик коснется верхней метки, включают секундомер и выключают его при прохождении шариком нижней метки. Измерения повторяют несколько раз, переворачивая вискозиметр и выждав время, необходимое для восстановления структуры.

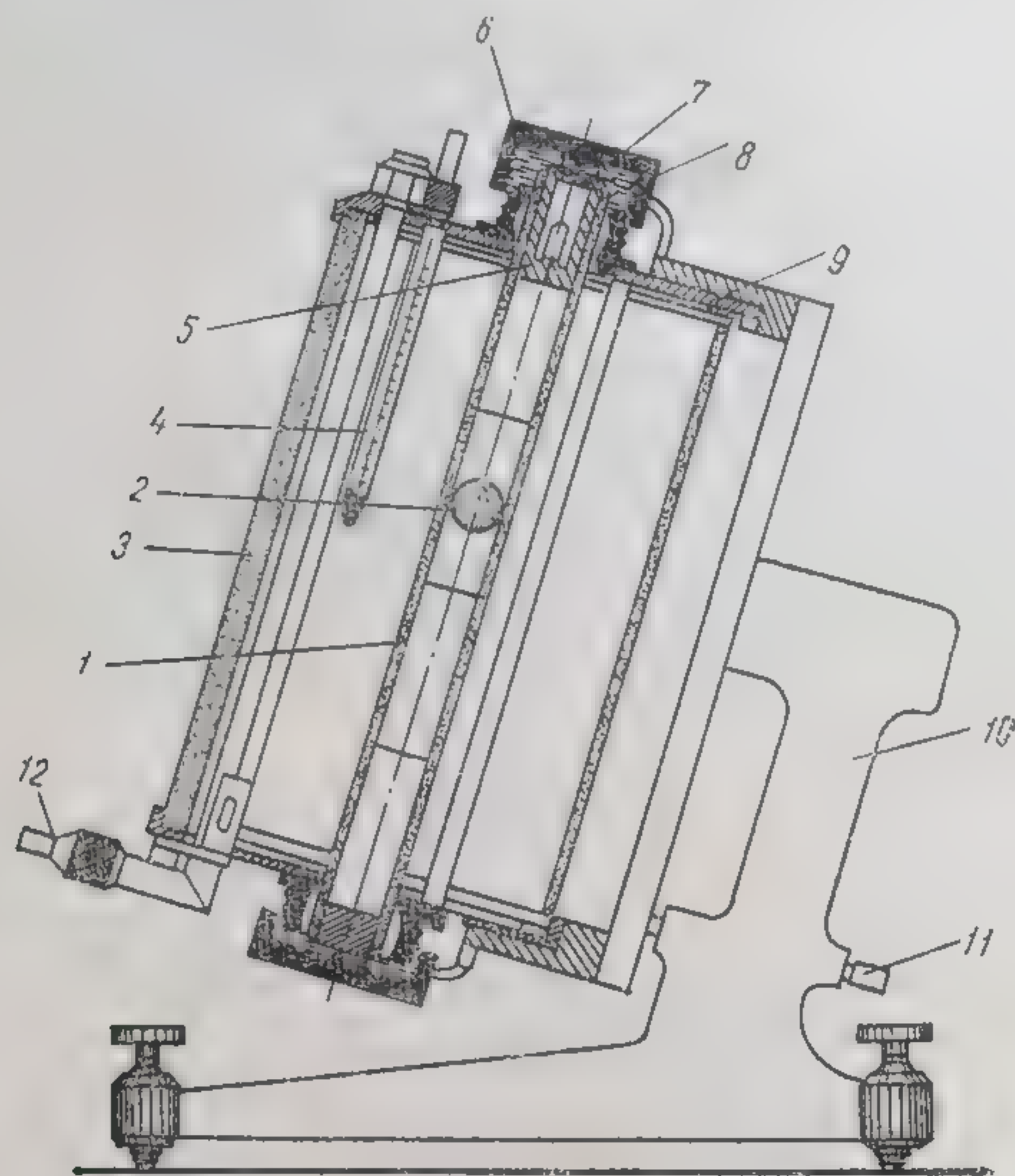


Рис. 31. Шариковый вискозиметр Гепплера:

1 — рабочая часть вискозиметра — прозрачная трубка; 2 — шарик; 3 — цилиндр для термостатирующей жидкости; 4 — термометр; 5 — колпачок для отвода жидкости из трубки; 6 — прижимающая гайка; 7 — емкость для сбора излишней жидкости; 8 — уплотняющее кольцо; 9 — крышка; 10 — подставка; 11 — установочный винт; 12 — штуцер для подвода жидкости

Расчет производят по уравнению Стокса:

$$V = \frac{H}{\tau} = \frac{2r^2(d - d_1) \cdot g}{9\eta}, \quad (50)$$

где V — скорость падения шарика;
 H — расстояние между метками (путь шарика);
 τ — время падения шарика между метками;
 r — радиус трубки;
 d и d_1 — соответственно плотность шарика и жидкости;
 g — ускорение силы тяжести;
 η — вязкость.

Определить
1. При помощи
определить

где η и η_0 т.е.

d, d_0

В литературе
ний, выполне
пищевых мас

В кондите
вязкости мас
а также зави
для карамель

Была изу
присутствия в

Изучалась
костного буль
подсолнечных

При сра
свойств крахм
зависимость в
нематическая
твора) была
[84].

Шариковый
ленности для
консервного п

Конический п

Прибор предл
назначен для
(рис. 32).

Методика

ляется по глу
туемое веществ

Вершину к

измеряемой си

скорость погру

конуса прекрат

повторяют до с

нусом предель

приложенной н

7 Заказ № 437

Обычно измерения ведут по отношению к какой-либо стандартной жидкости, тогда расчет упрощается и вязкость можно определить из соотношения

$$\eta = \eta_0 \frac{\tau (d - d_1)}{\tau_0 (d - d_0)}, \quad (51)$$

где η_0 и η , τ_0 и τ — соответственно вязкость, пуаз ($\text{Н} \cdot \text{сек}/\text{м}^2$), и время падения шарика (сек) для стандартной и исследуемой жидкостей;

d , d_0 и d_1 — плотность шарика стандартной и исследуемой жидкостей, $\text{г}/\text{см}^3$ ($\text{кг}/\text{м}^3$).

В литературе имеется много данных относительно исследований, выполненных на шариковом вискозиметре, для различных пищевых масс.

В кондитерской промышленности исследовалась зависимость вязкости масла какао в интервале температур от 35 до 54°С, а также зависимость вязкости от концентрации сухих веществ для карамельной патоки и сахаропаточного сиропа.

Была изучена зависимость вязкости сахарных сиропов от присутствия в них поваренной соли [181].

Изучалась зависимость вязкости от температуры для мясокостного бульона и свиного топленого жира [45], для соевых и подсолнечных мисцелл.

При сравнительных исследованиях физико-химических свойств крахмала обычной и восковидной кукурузы изучалась зависимость вязкости от температуры и концентрации [146]. Кинематическая вязкость (отношение вязкости к плотности раствора) была исследована для крахмалофосфатов зерна проса [84].

Шариковые вискозиметры используют в консервной промышленности для определения вязкостных характеристик продуктов консервного производства [17].

Конический пластометр

Прибор предложен П. А. Ребиндером и Н. А. Семененко и предназначен для измерения предельного напряжения сдвига (рис. 32).

(50) **Методика измерения.** Предельное напряжение сдвига вычисляется по глубине максимального погружения конуса в испытуемое вещество, находящееся в кювете.

Вершину конуса приводят в соприкосновение с поверхностью измеряемой системы. Снимают гирьку противовеса и измеряют скорость погружения конуса до его остановки. Когда движение конуса прекратится, снимают еще одну гирьку и наблюдение повторяют до следующей остановки конуса. При достижении конусом предельной величины погружения h_m , соответствующей приложенной нагрузке F , напряжение, действующее по боковой

поверхности конуса, будет равно предельному напряжению сдвига системы — P_m .

Вычисления производят по уравнению

$$P_m = K_\alpha \frac{F}{h_m^2}, \quad (52)$$

где P_m — предельное напряжение сдвига, $г/см^2$ ($кг/м^2$);

K_α — константа, зависящая от угла конуса (к прибору прилагается несколько конусов с различными углами и вычисленными константами, например $K_{\alpha=45^\circ} = 0,0658$, $K_{\alpha=90^\circ} = 0,159$);

F — груз, снятый с противовеса, $г$ ($кг$);

h_m — глубина погружения конуса, $см$ ($м$).

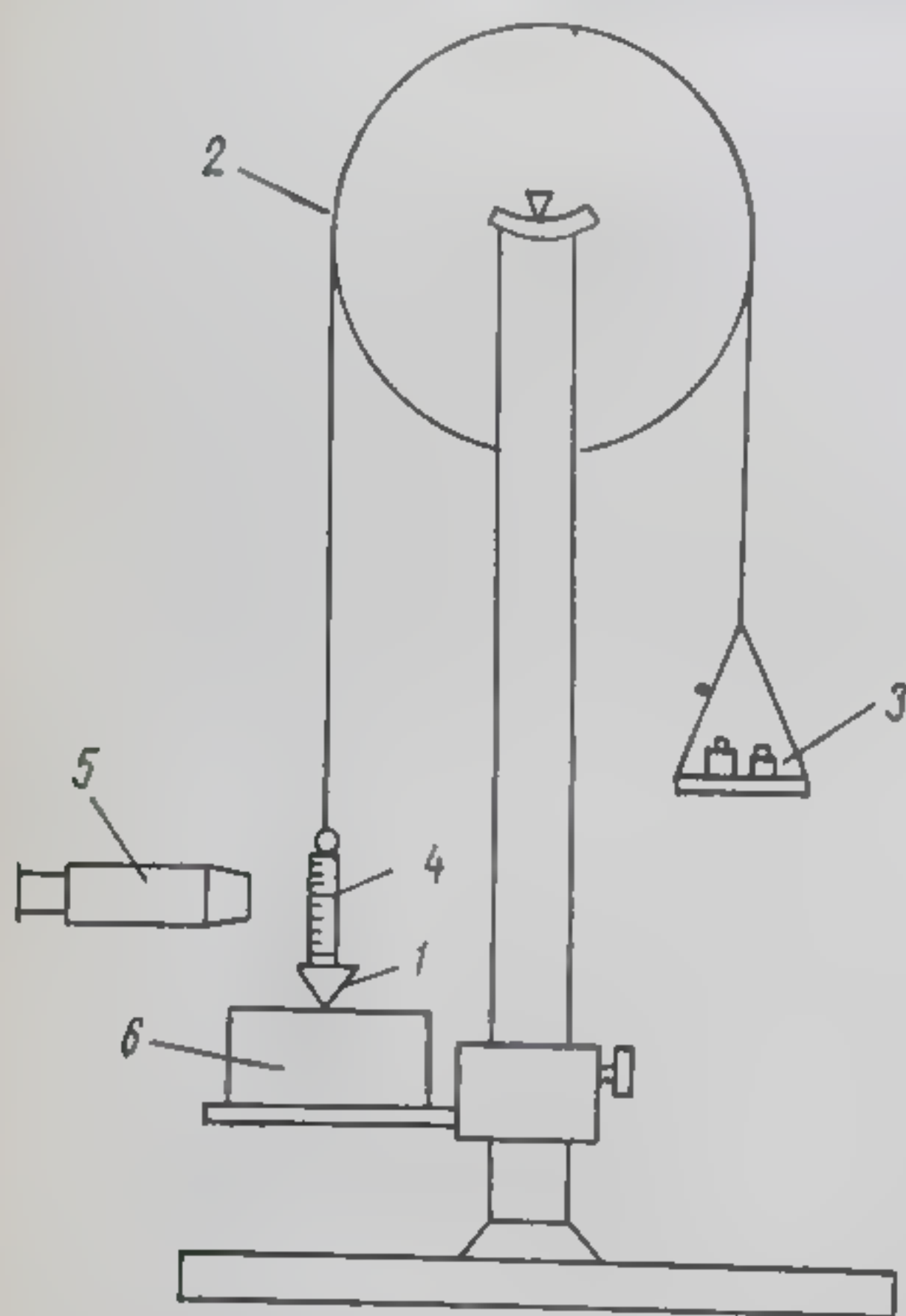


Рис. 32. Конический пластометр:
1 — конус; 2 — блок; 3 — груз; 4 — шкала;
5 — микроскоп; 6 — образец

Для вычисления предельного напряжения сдвига измерения производят трижды и берут среднее значение. Если требуется построить кривую кинетики деформации, то записывают показания микрошкалы во времени.

В пищевой промышленности часто используется конический пластометр отечественного производства КП-3, принцип работы на котором и способы расчетов не отличаются от описанного.

С помощью конического пластометра исследовались структурно-механические свойства сливочного масла, которое рассматривают как тело Бингама. Исследование проводилось с целью выработки объективного критерия для оценки его консистенции. Основные реологические характеристики находили по кривой кинетики деформации [86].

Л. С. Кузнецовой и другими исследователями изучался процесс студнеобразования фруктово-желейных систем и влияние на него различных факторов (количества добавляемого сахара, влажности, pH и др.). По величине предельного напряжения сдвига определяли пластическую прочность помадной массы [132], желейной кондитерской массы на основе поливинилового спирта [11], студней окисленного крахмала с добавками альгината натрия, агара и агароида, рекомендованных для изготовления желейного мармелада [80], рахат-лукума [37]. Определение величины предельного напряжения сдвига рекомендовано для оценки качества халвы [148].

Коническим пластометром исследовались структурно-механические свойства сахарного теста, изучалось влияние поверхностно-активных веществ и влажности на его пластическую прочность [133].

Исследования влияния подсолнечных фосфатидов на пластическую прочность теста позволили рекомендовать сокращение сроков его брожения [78].

Величину предельного напряжения сдвига неоднократно использовали для выработки объективного критерия характеристики консистенции сычужных сыров [91, 172]; а также для исследования влияния различных факторов на их консистенцию.

5.3.2. ПРИБОРЫ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ДЕФОРМАЦИИ ОДНООСНОГО СЖАТИЯ

Если структура продукта неоднородна и он обладает значительной вязкостью, то его консистенцию характеризуют деформацией одноосного сжатия (реже растяжения, что связано с трудностью закрепления образца и учета деформации формоизменения).

Прибор Николаева и Шпигельгляса

На рис. 33 представлена схема прибора.

Методика измерения. Образец в виде бруска размером 50 × 50 мм и высотой 40 мм помещают между параллельными плоскостями 2 и 3, при этом столик 2 опущен до предела. Поднимая столик 2 до соприкосновения образца с плоскостью 3, измеряют первоначальную длину образца. Если в таком положении на грузочную площадку поместить определенный груз 4, то можно по перемещению стрелки определить величину условно мгновенной деформации на шкале прибора. Затем, включив секундомер, определяют ее изменение во времени до состояния равновесия приложенного усилия и внутреннего сопротивления образца. По результатам измерений строится кривая кинетики деформации. Зная начальное сечение образца и вес груза вместе со столиком, по величине условно-мгновенной упругой деформации и начальной длине образца вычисляют модуль упругого сжатия:

$$E = \frac{P}{\epsilon}; \quad P = \frac{F}{S}; \quad \epsilon = \frac{\Delta l}{l}, \quad (53)$$

где E — модуль сжатия, $г/см^2$ ($кг/м^2$);
 P — рабочее напряжение, $г/см^2$ ($кг/м^2$);
 S — площадь сечения, $см^2$;
 ϵ — безразмерная величина деформации;
 l — длина образца, $см$ ($м$);
 Δl — изменение длины в процессе деформации, $см$ ($м$).

Вязкость определяют по уравнению

$$\eta_{\text{эф.}} = P \left/ \frac{dv}{dx} \right., \quad (54)$$

где dv — скорость деформации (отношение изменения высоты образца ко времени), см/сек (м/сек);

dx — среднее расстояние между пластинами, см (м).

Если пересчитать напряжение на изменившееся сечение образца в состоянии равновесия, то можно получить предельное напряжения сдвига.

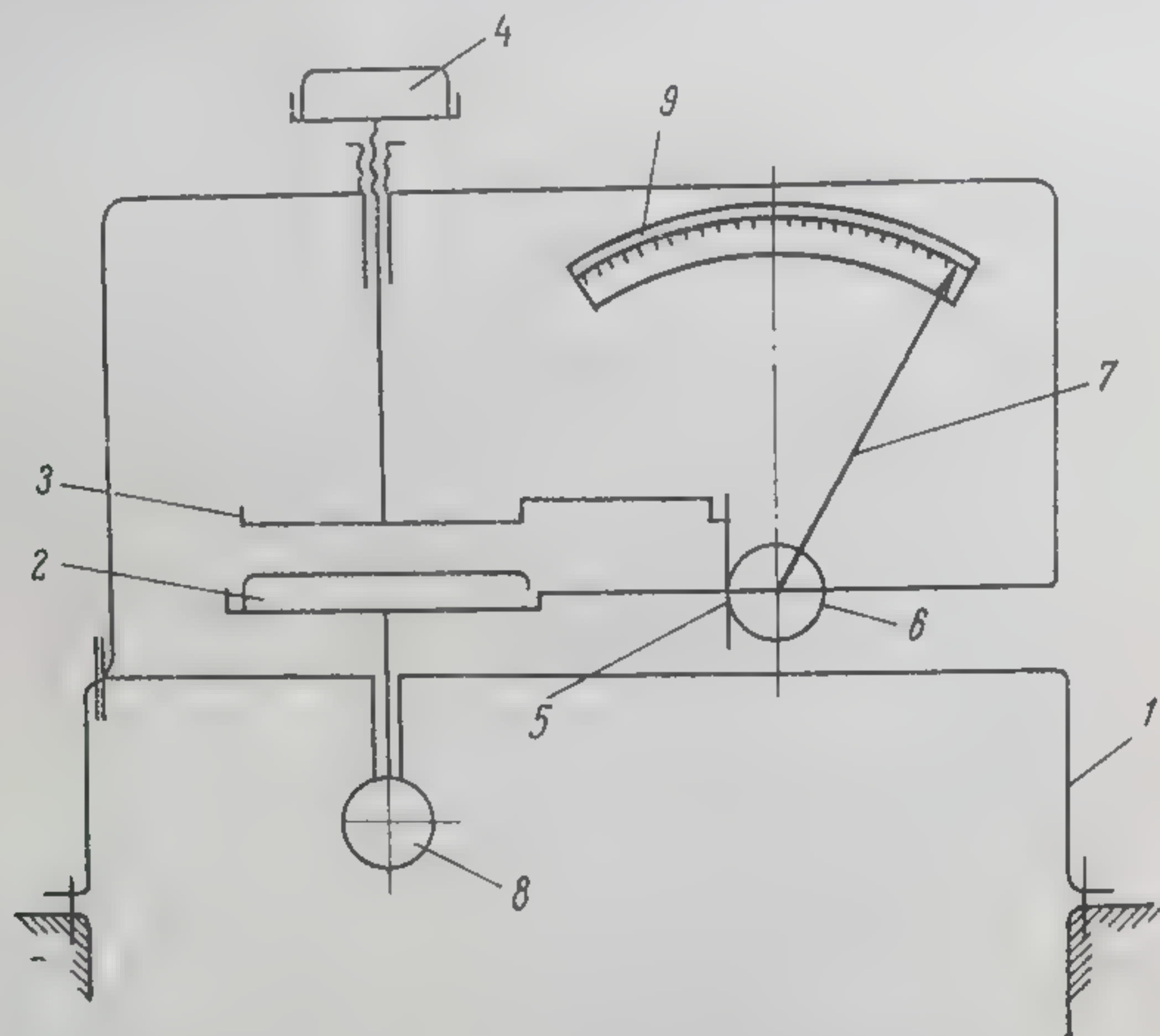


Рис. 33. Схема прибора Николаева и Шпигельгласа:

1 — станина; 2, 3 — диски, между которыми помещают образец; 4 — груз; 5 — рейка; 6 — шестерня; 7 — стрелка; 8 — эксцентрик, дающий возможность диску 2 перемещаться в вертикальной плоскости; 9 — шкала

С помощью указанного прибора исследовались реологические свойства хлебного мякиша, твердых сычужных сыров [150], изучались изменения их консистенции в процессе хранения.

Динамометрические весы

В последние 5—7 лет появились работы, в которых деформация одноосного сжатия исследуется на модифицированных динамометрических весах (рис. 34).

Прибор первоначально был предложен для исследования структурно-механических свойств студней. Он представляет собой аналитические весы типа АДВ-200М, где правая часть оставлена без изменения, а в левой части вместо чаши весов на тонкой стальной нити 5 подвешен пуансон 2.

Весы устанавливают на специальную станину, которая стальными направляющими крепится к рабочему столу. К столу присоединена металлическая рубашка термостата 1. В центре рабочего стола помещен микрометрический винт 4 с держателем для установки и вертикального перемещения образца.

В ненагруженном состоянии весы уравновешены. В осветителе аналитических весов установлена лампочка мощностью 12—15 Вт для четкого проектирования микрошкалы на матовый экран. Металлическая рубашка 1 и рабочий столик образуют рабочую камеру прибора. В рубашку подается вода из ультратермостата. Температура в рабочей камере контролируется термометром 6 или термопарой с точностью до $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Для предотвращения высыхания образца в процессе измерения пространство рабочей камеры насыщается парами воды. Вода в количестве нескольких капель заливается перед началом измерений в специальную канавку 3 на рабочем столике.

Прибор дает возможность точно и удобно измерять деформацию образца в пределах от 0,01 до 5 мм и получать хорошо воспроизводимые результаты; ошибка измерения деформации 5%.

С помощью описанного прибора можно изучать зависимость деформации от напряжения, температуры и времени для систем, имеющих модуль упругости от 10^{-3} до 10 кг/м^2 .

Методика измерения. Перед началом работы необходимо определить цену деления микрошкалы. Для этого, установив весы на нуль, помещают на рабочий столик металлическую пластинку с точно известной толщиной и опускают пуансон. По светящейся с точно известной толщиной пластинке подсчитывают число делений. Разделив толщину пластинки на число делений, получают цену одного деления.

Образцы для измерений должны иметь цилиндрическую форму ($d=10\text{—}13\text{ мм}$; $h=13\text{—}20\text{ мм}$), причем особые требования предъявляют к параллельности торцов. В литературе приведено несколько способов изготовления таких образцов [25].

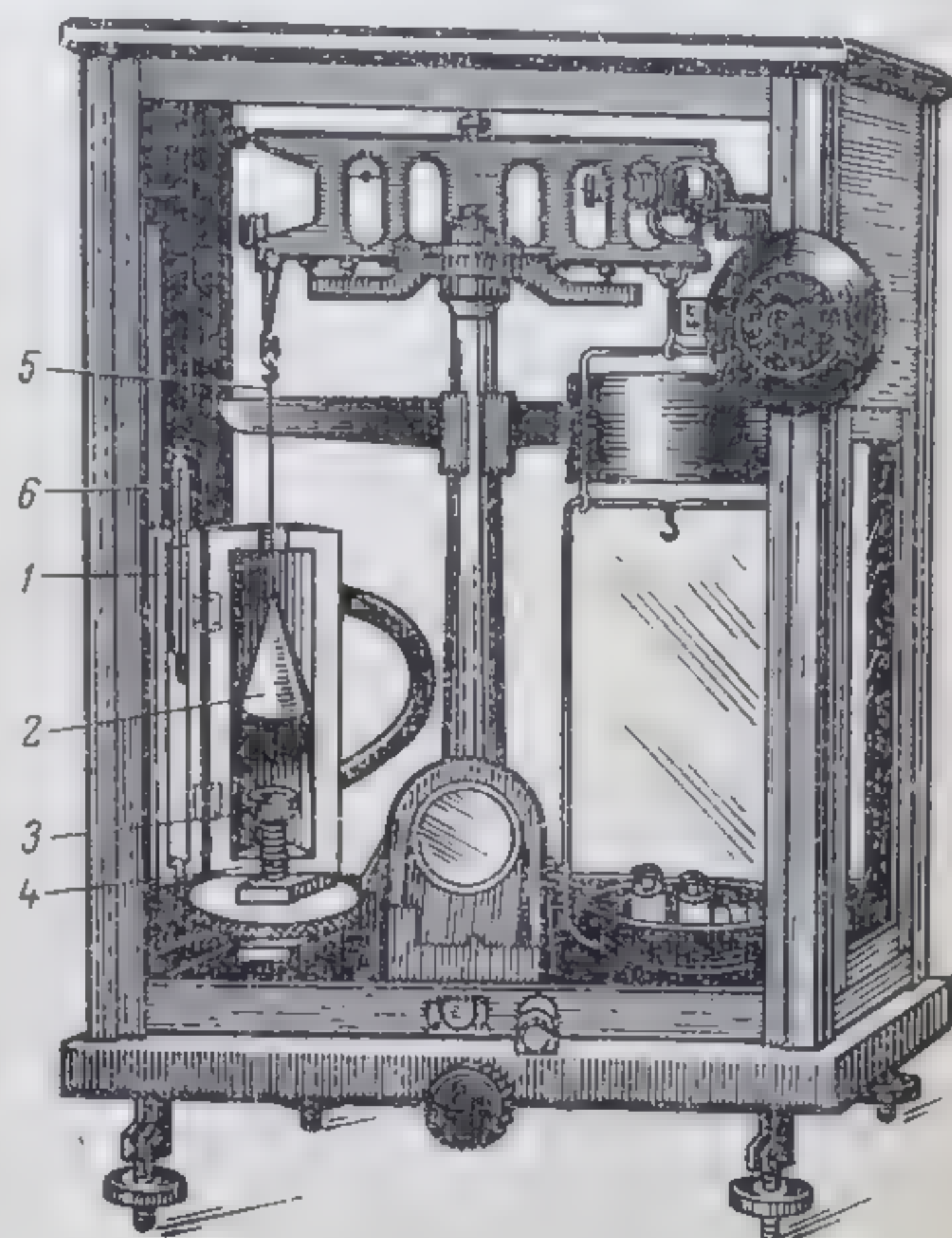


Рис. 34. Динамометрические весы:

1 — рубашка термостата; 2 — пуансон; 3 — канавка рабочего столика; 4 — микрометрический винт для установки и вертикального перемещения образца; 5 — стальная нить; 6 — термометр

В канавку на рабочем столике заливают несколько капель дистиллированной воды, устанавливают образец, закрывают термостатирующую рубашку и определяют нулевую точку отсчета.

Для определения нулевой точки отсчета предлагается следующий способ. Измеряют мгновенные деформации минимум при трех значениях нагрузки (например, при 1, 2 и 3 г). Через экспериментальные точки в координатах нагрузка-время проводят прямую. Экстраполируя эту прямую к нулевой нагрузке, получают отрезок на оси ординат, который принимают за нулевую точку отсчета и в дальнейшем вычитают из каждого показания [185].

Определив нулевую точку, образец термостатируют при данной температуре в течение 15—30 мин. Все это время весы закрыты, и груз не давит на образец. По окончании термостатирования одновременно включают действие нагрузки (снимают с чашки весов некоторый груз) и секундомер. В первые 5—10 мин отсчет по шкале производят через каждые 30 сек, затем, когда деформация начинает нарастать медленнее, время отсчета увеличивают. Время измерения подбирается для каждой массы отдельно.

Сняв загрузочную часть кривой, весы на мгновение закрывают, чтобы поместить на чашку весов ранее снятый груз, затем включают их одновременно с секундомером и снимают разгрузочную часть кривой во время «отдыха» образца.

По кривой кинетики деформации, построенной в координатах податливость-время, можно вычислить вязкость (см. стр. 178).

Модуль упругости находят из соотношения

$$E = \frac{P}{\varepsilon}, \quad (55)$$

где P — напряжение, равное F/S , г/см² или кг/м² (F — вес груза, г или кг; S — площадь сечения образца, см² или м²); ε — деформация, равная $\frac{a \cdot n}{h}$ (a — число делений микрошкалы, n — цена деления, h — высота образца, см или м).

Для графических построений вместо модуля упругости удобно пользоваться обратной величиной — податливостью:

$$I = \frac{\varepsilon}{P}. \quad (56)$$

С помощью описанного прибора были исследованы структурно-механические свойства смешанных альгинат-крахмальных студней [209], термомеханические свойства смешанных студней желатина и альгината кальция [198]. Изучалась также податливость в зависимости от концентрации для студней желатина

[25] и мармеладных масс [26], причем в последнем случае было рекомендовано заменить применяющийся в кондитерской промышленности прибор Валента, дающий показания не в абсолютных единицах, динамометрическими весами.

* * *

Рассмотренные выше приборы и методы расчета реологических характеристик, а также результаты их практического использования показывают, что реологические методы могут служить целям как исследований, так и усовершенствования технологических процессов. Получение же результатов измерений в абсолютных единицах дает возможность сравнивать данные различных исследователей.

6

ПРИБОРЫ И ТЕХНИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Наряду с физико-химическими исследованиями в производственных условиях и в лабораториях получили распространение автоматизированные методы контроля качества продуктов питания.

6.1. КЛАССИФИКАЦИЯ АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТАВА И СВОЙСТВ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Автоматизация процесса определения свойств, характеризующих качество пищевых продуктов, является важным этапом дальнейшего развития и совершенствования методов их исследования.

Обеспечивая высокую точность определения соответствующих показателей, автоматизированные контрольно-измерительные приборы и устройства позволяют значительно сократить затраты времени на проведение анализа и измерений при производстве, транспортировании, хранении и реализации пищевых продуктов.

Применяемые в настоящее время автоматизированные методы определения состава и свойств пищевых продуктов весьма разнообразны. Они основываются на использовании физических, химических, электрических, ядерных и других эффектов взаимодействия исследуемых продуктов с первичными преобразователями (датчиками). Сигналы от датчиков воспринимаются вторичными приборами и преобразуются в информацию.

Многообразие применяемых схем и конструкций датчиков и вторичных приборов обуславливает необходимость классификации этих методов и их систематизации. Для практического использования наиболее удобной является классификация методов контроля состава и свойств веществ непосредственного измерения [61], приведенная в табл. 13.

6.2. ТРЕБОВАНИЯ К ТЕХНИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ ДЛЯ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО КОНТРОЛЯ

К приборам, применяемым для исследования пищевых продуктов, предъявляют особенно строгие требования. Многие пищевые продукты содержат химически активные вещества, по-

Таблица 13

**Классификация методов контроля состава и свойств веществ
непосредственного измерения**

Контролируемые параметры, характеризующие свойства продукта	Определяемые свойства	Методы контроля
Механические	Плотность Удельный вес Коэффициент динамической и кинематической вязкости	Поплавковый, весовой, гидростатический, динамический Капиллярный, падающего шарика, вращающихся поверхностей
Термодинамические	Тепловой эффект реакции Упругость паров	Термохимический Манометрический
Электрохимические	Электрическая проводимость Электродный потенциал Сдвиг электродного потенциала Потенциал выделения ионов и предельная плотность тока Скорость электролиза	Кондуктометрический Потенциометрический Деполаризационный, гальванический Полярографический Кулонометрический
Волновые	Интенсивность излучения, рассеяния и поглощения света Показатель преломления света Вращение плоскости поляризации Интенсивность взаимодействия со средой рентгеновских и радиоактивных излучений Скорость распространения и поглощения ультразвука Интенсивность поглощения электромагнитных колебаний	Фотометрический, фотоколориметрический, нефелометрический, спектрометрический, оптико-акустический, квантометрический Рефрактометрический, интерферометрический Поляриметрический Рентгеноспектрометрический, радиоизотопный Ультразвуковой Ядерно-магнитного резонанса, электронный, парамагнитного резонанса
Электрические и магнитные	Электрическая проводимость газов и паров Диэлектрическая проницаемость Удельная магнитная восприимчивость Удельный заряд частиц	Термической ионизации, ионизации радиоактивными излучениями, фотоионизации Диэлькометрический, емкостный Термомагнитный, магнитоэффузионный, магнитомеханический Масс-спектрометрический

этому контактирующие с ними материалы должны обладать устойчивостью к коррозии и эрозии. В то же время должна быть исключена возможность воздействия этих материалов на исследуемые пищевые продукты, приводящего к ухудшению их вкуса и цвета, снижению пищевой ценности, появлению постороннего запаха и т. д.

При проведении исследований необходимо устранить возможность развития побочной микрофлоры и исключить попадание токсичных веществ в продукт.

Исследования, проводимые с использованием радиоактивных, высокочастотных и ультразвуковых приборов, должны осуществляться с учетом возможности вредного влияния излучений на качество пищевых продуктов и их микрофлору [163].

Технические средства для автоматизированного контроля состава и свойств пищевых продуктов должны соответствовать требованиям Государственной системы промышленных приборов и средств автоматизации (ГСП).

ГСП представляет собой совокупность унифицированных нормализованных рядов блоков, приборов и устройств для получения, обработки и использования информации, которые соответствуют единым техническим требованиям, имеют единые параметры входных и выходных сигналов и единые нормализованные габаритные и присоединительные размеры, а также экономически целесообразную точность, надежность и долговечность. Изделия ГСП изготавливаются на основе базовых конструкций с унифицированными структурами, конструктивными параметрами и сигналами, обеспечивающими максимально возможный уровень унификации и общую технологическую базу для производства [47].

В настоящее время для исследования свойств и состава пищевых продуктов используется значительное количество приборов, разработанных до внедрения системы ГСП. Постепенный переход к использованию унифицированных приборов, соответствующих всем требованиям ГСП, позволит повысить эффективность системы контроля качества пищевых продуктов и обеспечить дальнейшее развитие производства пищевых продуктов по пути его полной автоматизации.

6.3. ДИСТАНЦИОННОЕ ИЗМЕРЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ВЛАЖНОСТИ СЫПУЧИХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

В настоящее время получили широкое распространение методы дистанционного измерения температуры и влажности сыпучих пищевых продуктов (сахара-песка, зерна и др.) в процессах их сушки и хранения [39, 177, 35]. Применение этих методов позволяет повысить эффективность и усовершенствовать технологию указанных процессов за счет значительного сокращения затрат

времени на определение соответствующих показателей и устранение такой трудоемкой операции, как систематический отбор проб.

Сущность методов дистанционного измерения температуры и влажности сыпучих пищевых продуктов заключается в следующем. Датчики прибора, определяющие один или два параметра (температуру, влажность), помещаются в различных точках продукта. С помощью коммутационного кабеля датчики соединяются с вторичным (показывающим или регистрирующим) прибором. Периодически производится снятие показаний прибора и на основе полученных данных определяются изменения температурного и влажностного поля в массе продукта.

Параллельно измеряются температура и влажность окружающего продукт воздуха.

Полученная информация позволяет проследить за развитием процессов тепло- и массообмена между продуктом и окружающим воздухом, а также тепло- и массопереноса внутри самого продукта и служит основой для проведения мероприятий по регулированию этих процессов.

В качестве датчиков при дистанционных измерениях температуры обычно используют проволочные или полупроводниковые термосопротивления, а также термопары.

Измерение температуры термометрами сопротивления основано на свойстве токопроводящего материала (провода или полупроводника) изменять свое электрическое сопротивление в зависимости от изменения температуры. При увеличении температуры величина электрического сопротивления металлических проводников возрастает, а у полупроводников убывает.

В настоящее время серийно выпускаются две группы проволочных термометров сопротивления: платиновые (ТСП) и медные (ТСМ). Для работы в интервале температур от -50 до 180°C используют медные термометры сопротивления; а для более широкого диапазона температур от -200 до 650°C — платиновые [193].

Полупроводниковые термометры сопротивления (термисторы) изготавливаются из смеси окислов некоторых металлов. Отечественная промышленность выпускает термисторы медно-марганцевые типа ММТ и кобальто-марганцевые типа КМТ [163].

От других термометров сопротивления термисторы отличаются наибольшей чувствительностью. Они компактны и для защиты от воздействия внешней среды могут быть остеклованы.

Недостатками термисторов являются относительно небольшой диапазон измеряемых температур (от -70 до $120-180^{\circ}\text{C}$) и значительный разброс отдельных экземпляров по номиналу сопротивления (до 20%), что исключает взаимозаменяемость без дополнительной регулировки измерительной схемы.

Вторичные приборы, применяемые в комплекте с проволочными термометрами сопротивления и термисторами, можно разделить на три группы: логометры (омметры), уравновешенные и неуравновешенные мосты.

Принцип действия логометров основан на взаимодействии поля постоянного магнита и магнитных полей, которые создаются токами, протекающими в двух скрещенных под некоторым углом и жестко скрепленных между собой рамках. Магнитная система логометра обеспечивает наибольшую величину магнитной индукции по линии, проходящей через середину магнитных наконечников и центр цилиндрического сердечника, вокруг которого вращаются рамки. При изменении сопротивления датчика через одну из рамок течет ток большей силы, равенство моментов нарушается, и подвижная система, связанная со стрелкой прибора, поворачивается. Достоинством прибора является то, что в определенных пределах колебания питающего моста напряжения не влияют на показания прибора [28].

Наиболее распространенными приборами для измерения электрического сопротивления термисторов являются уравновешенные мосты.

Принцип их действия заключается в поддержании равновесия между плечом моста, в которое включено термосопротивление, и уравновешивающим плечом моста, в цепи которого находится реохорд, обеспечивающий необходимое равновесие. Уравновешенные мосты могут работать при небольших отклонениях величины питающего напряжения.

Неуравновешенные мосты применяются в основном с полупроводниковыми термометрами сопротивления, но так как они чувствительны к колебаниям напряжения питания, их использование ограничено.

Измерение температуры с помощью термоэлектрических термометров основано на использовании термоэлектрического эффекта. Этот эффект заключается в возникновении электрического тока в замкнутой цепи, которая состоит из двух разнородных проводников при разности температур в местах их соединения (спая).

В зависимости от применяемых материалов термопары делятся на две группы: термопары из благородных металлов и термопары из неблагородных металлов. К первой группе относится, например, платинородий — платиновая термопара (ТПП), имеющая верхний предел измерения 1300°C . Ко второй группе относятся термопары хромель-алюмелевая (ТХА) для измерения температур до 1000°C , хромель-копелевая (ТХК) с верхним пределом измерения 600°C , медь-константановая для измерения температур до 400°C и др.

Для защиты от механических повреждений и воздействия химически агрессивных сред термопары помещают в специальные защитные чехлы. Термоэлектроды изолируют друг от друга и от

защитной арматуры с помощью керамических или стеклянных изоляторов (бус).

Для измерения термоэлектродвижущей силы (т. э. д. с.) в цепь термопары включают милливольтметр или потенциометр. Шкала показывающего прибора может быть для удобства снятия показаний градуирована непосредственно в градусах [39].

Милливольтметры и потенциометры, применяемые в качестве вторичных приборов для измерения т. э. д. с. термоэлектрических термометров, в зависимости от конструкции могут работать в комплекте с одной или несколькими термопарами и иметь устройства для регистрации показаний на ленте или диаграмме.

Принцип действия милливольтметров основан на взаимодействии электрического тока, протекающего по виткам вращающейся рамки с магнитным полем постоянного магнита, между полюсами которого размещается рамка. Угол поворота рамки зависит от величины т. э. д. с.

Измерение т. э. д. с. с помощью потенциометров осуществляется компенсационным методом. При этом измеряемая т. э. д. с. уравнивается до известного падения напряжения на калиброванном сопротивлении, а результирующий эффект измеряемой и известной э. д. с., подаваемых на измерительный прибор, доводится до нуля. В качестве нормального элемента применяют ртутно-кадмевый гальванический элемент Вестона, обладающий при температуре 20°С э. д. с. 1,0183 В и сохраняющий ее при малых нагрузках.

Дистанционное определение влажности сыпучих пищевых продуктов представляет собой более сложную задачу по сравнению с определением их температуры. Это объясняется спецификой определяемого параметра. Если при измерении температуры продукта достаточно получить информацию о степени нагретости, или, иначе говоря, о средней кинетической энергии молекул данного продукта в целом, то при определении влажности необходимо установить соотношение между молекулами исследуемого вещества и молекулами воды, находящимися в продукте.

Известно, что пищевые продукты могут удерживать влагу различными способами, т. е. существует несколько форм связи влаги с основным материалом, отличающихся по своей энергии и соответственно прочности связи. Кроме того, присутствующая в продукте влага оказывает влияние на его свойства: плотность, сыпучесть, упругость, диэлектрическую проницаемость, электросопротивление и др. Эти причины затрудняют решение задачи дистанционного определения влажности для многих пищевых продуктов, однако в отношении сыпучих пищевых продуктов намечен определенный прогресс.

В настоящее время разработаны и практически осуществлены в производственных условиях методы дистанционного измерения влажности сахара-песка, зерна и других сыпучих пище-

вых продуктов. Такие методы основаны на зависимости изменения электрофизических свойств от изменения влажности продукта.

Одним из методов дистанционного измерения влажности продуктов является емкостный метод. В основу емкостного метода измерения влажности положено свойство продукта изменять величину диэлектрической проницаемости с изменением влажности. Известно, что диэлектрическая проницаемость воды является величиной постоянной и близка к 81 ($\epsilon \sim 81$ ф/н), а для большинства сухих веществ она находится в пределах от 2 до 10. Поэтому даже незначительное изменение влажности вещества вызывает изменение его диэлектрической проницаемости [163].

Этот метод позволяет достаточно точно определять количество свободной (удаляемой высушиванием) влаги в продукте.

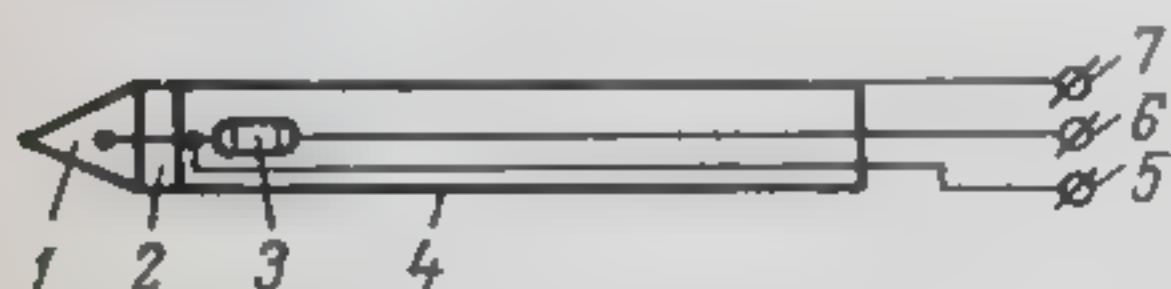


Рис. 35. Схема датчика влагомера:

1 — конический наконечник; 2 — фторопластовый изолятор; 3 — термистор типа ММТ-1-100; 4 — корпус; 5, 6, 7 — выводы

Для связанной влаги (молекулы воды, связанные с твердым веществом ионными, молекулярными связями) этот метод неприменим, так как величина диэлектрической проницаемости связанной воды от 2,2 до 15 ф/н. Определение влажности пищевого продукта емкостным методом сводится к измерению величины диэлектрической проницаемости продукта.

При емкостном методе используются три основных устройства: высокочастотный генератор, датчик и измерительный прибор.

Датчики емкостных влагомеров представляют собой цилиндрические или плоские конденсаторы, внутрь которых вводится исследуемый продукт. На обкладки конденсатора подается напряжение и измеряется его емкость. При этом учитывают, что на величину емкости конденсаторного датчика, помимо диэлектрической проницаемости, влияют плотность укладки и масса материала, его температура, электрическая проводимость и другие факторы. Для уменьшения влияния этих факторов вводятся соответствующие поправки.

В настоящее время разработаны и применяются емкостные влагомеры для зерна, обеспечивающие дистанционный контроль его влажности. Прибор АВП (разработанный во ВНИИЗе) позволяет определить влажность зерна в диапазоне 10—20% с точностью до $\pm 1\%$. Имеются аналогичные приборы ОТИ-1 и ОТИ-2.

Кондуктометрический метод измерения влажности широко применяется для таких сыпучих пищевых продуктов, как зерно, мука, сахар-песок и др. Этот метод основан на зависимости между влажностью продукта и его электрическим со-

противлением. Определение влажности кондуктометрическим методом сводится к измерению сопротивления материала.

Измерительное устройство состоит из датчика, представляющего собой пару электродов, с помощью которых через исследуемый продукт пропускается электрический ток, и вторичного прибора, измеряющего сопротивление.

Ниже в качестве примера рассмотрено устройство прибора для дистанционного определения влажности и температуры сахара-песка [35].

Прибор состоит из датчика, тераметра типа Е-6-3 и коммутационного устройства. На рис. 35 изображена схема датчика влагомера. Electroдами служат конический наконечник 1 и корпус 4. Они разделены между собой фторопластовым изолятором калиброванной толщины. Для определения температуры внутри датчика установлен термистор 3 типа ММТ-1-100. Измерение электросопротивления сахара-песка, а также сопротивления термистора осуществляется с помощью тераметра типа Е-6-3, имеющего рабочий диапазон измерений от 10^3 до 10^{12} Ом. Погрешность измерения по величине влажности $\pm 0,01\%$, по температуре $\pm 1^\circ\text{C}$. В комплект прибора входят 5—10 датчиков, обеспечивающих дистанционность измерения до 10—15 м.

Практическое применение описанных выше приборов для определения температуры и влажности сыпучих пищевых продуктов позволяет решать проблему контроля их качества на более высоком научном уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Книга не содержит исчерпывающего описания всех современных методов исследования и не является исчерпывающей сводкой литературы. В ней приведены лишь основные литературные источники последних десяти лет.

Основная цель книги состоит в том, чтобы способствовать успешному применению спектральных, хроматографических, люминесцентных и реологических методов для анализа пищевых продуктов. Однако методы исследования качества пищевых продуктов многочисленны и разнообразны. Поэтому наряду с рассмотренными важное значение будут приобретать масс-спектроскопические, радиоспектроскопические, ядерномагнитный резонанс, рентгеноструктурный анализ, электрофорез и другие новейшие методы исследования, разрабатываемые в смежных областях науки.

1. Азаров, 1970.
2. Авраамов, 1970.
3. Айвазовский, 1970.
4. Алейников, 1970.
5. Алейников, 1970.
6. Алиев, 1970.
7. Амаев, 1970.
8. Амаев, 1970.
9. Амаев, 1970.
10. Артамонов, 1970.
11. Артамонов, 1970.
12. Артамонов, 1970.
13. Артамонов, 1970.
14. Артамонов, 1970.
15. Артамонов, 1970.
16. Артамонов, 1970.
17. Артамонов, 1970.
18. Артамонов, 1970.
19. Артамонов, 1970.
20. Артамонов, 1970.
21. Артамонов, 1970.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азаров Б. М. и др. «Хлебопекарная и кондитерская промышленность», 1970, № 8, с. 20.
2. Авраменко В. Н., Есельсон М. П., Зайка А. Информационные спектры пищевых продуктов. М., «Пищевая промышленность», 1974.
3. Айвазов Б. В. Практическое руководство по хроматографии. М., «Высшая школа», 1968.
4. Алекаев Н. С. Влияние различных видов кулинарной тепловой обработки на белковый и липидный компоненты риса. Канд. дисс. М., 1970.
5. Алекаев Н. С., Аман М., Бехова Е. А., Завгородняя В. Д. Количественный анализ классов липидов методом тонкослойной хроматографии.— В сб. научных трудов «Вопросы технологии приготовления продуктов общественного питания», вып. 1, с. 155. М., изд. МИНХа, 1972.
6. Алимova Е. К., Аствацатурьян А. Т. Исследования жирных кислот и липидов методом хроматографии. М., «Медицина», 1967.
7. Аман М. Исследование липидного и белкового компонентов мышц зеркального карпа и щуки при различных способах хранения и тепловой обработки. Канд. дисс. М., 1971.
8. Аман М., Алекаев Н. С., Бехова Е. А., Завгородняя В. Д. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1970, № 6, с. 22.
9. Аман М., Смирнова Г. А. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1971, № 2, с. 42.
10. Арасимович В. В., Балтага С. В., Пономарева Н. П. Методы анализа пектиновых веществ, гемицеллюлоз и пектолитических ферментов в плодах. Кишинев, Изд. АН Молд. ССР, 1970, с. 15.
11. Арустамова Э. Д., Никифорова В. Н. «Хлебопекарная и кондитерская промышленность», 1973, № 10, с. 15.
12. Артемьев Б. В., Архипцев Н. Е. Технологическая инструкция по пользованию АПЗ-метода для исследования газовых фаз пищевых продуктов. М., 1971.
13. Арямова И. И., Цупак Л. Е., Морозов А. С. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1971, № 1, с. 64.
14. Астахова Л. Г. Исследование роли кислот табака и его дыма в процессах формирования качества. Канд. дисс. Краснодар, 1970.
15. Ахрем А. А., Кузнецова А. И. Тонкослойная хроматография. М., «Наука», 1964.
16. Аязбекова М. А., Репина Л. Г. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1969, № 5, с. 165.
17. Бабарин В. П. Методы исследования физико-механических свойств жидких и пюреобразных продуктов консервного производства. М., ЦНИИ-ТЭИпищепром, 1971.
18. Бабко А. К., Дубовенко Л. И., Луковская Н. М. Хемиллюминесцентный анализ. Киев, «Техника», 1966.
19. Бабушкин А. А., Бажулин П. А., Королев Ф. А., Левшин Л. В., Прокофьев В. К., Стриганов А. Р. Методы спектрального анализа. М., Изд. МГУ, 1962.
20. Березкин В. Г. Аналитическая реакционная газовая хроматография. М., «Наука», 1966.
21. Березкин В. Г. и др. Газовая хроматография в нефтехимии. М., «Наука», 1975.

22. Березкин В. Г., Татаринский В. С. Газохроматографические методы анализа примесей. М., «Наука», 1970.
23. Берчфилд Г., Сторрс Э. Газовая хроматография в биохимии. М., «Мир», 1964.
24. Бирфельд А. А., Мачихин Ю. А. «Хлебопекарная и кондитерская промышленность», 1970, № 6, с. 12.
25. Браудо Е. Е., Изюмов Д. Б. и др. Методы определения физико-химических свойств и оценка качества желатина. М., ЦНИИТЭИмясомолпром. Серия «Клеежелатиновая промышленность», 1972.
26. Бровко О. Б., Изюмов Д. Б. Тезисы докл. научн. симпозиума на тему: «Проблемы физико-химической механики и ее роль в усовершенствовании производства пищевых продуктов». М., «Знание», 1972.
27. Бузун Г. А., Джемухадзе К. М., Милешко Л. Ф., Гелашвили Н. И. Применение полиамида для выделения белков и ферментов из растений, богатых фенольными соединениями.— В кн. «Методы современной биохимии». Под ред. В. Л. Кретовича, К. Ф. Шольц. М., «Наука», 1975.
28. Вайнберг А. Я. Приборы технологического контроля в молочной промышленности. М., «Пищевая промышленность», 1971.
29. Валеева А. И., Горяев М. И. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1968, № 2, с. 33.
30. Валуйко Г. Г. Биохимия и технология красных вин. М., «Пищевая промышленность», 1973.
31. Верещагин А. Г. «Успехи химии». Т. 23, 1963, № 11, с. 1349.
32. Верещагин А. Г. и др. «Биохимия». Т. 28, 1963, № 5, с. 868.
33. Верещагин А. Г., Новицкая Г. В. «Физиология растений». Т. 9, вып. 1, 1972, с. 212.
34. Владимиров Ю. А., Литвин Ф. Ф. Фотобиология и спектральные методы исследования. М., «Высшая школа», 1964.
35. Волков М. А., Церевитинов О. Б., Михайлов В. Д. «Сахарная промышленность», 1973, № 6, с. 43.
36. Волынец М. П. Тонкослойная хроматография в неорганическом анализе. М., «Наука», 1974.
37. Габзималин В. Г. «Хлебопекарная и кондитерская промышленность», 1970, № 5, с. 19.
38. Гаврикова Э. В., Козьмина Н. П., Творогова Н. Н. «Прикладная биохимия и микробиология». Т. XI, вып. 1, 1975, с. 78.
39. Генкин Л. С. Основы автоматического регулирования технологических процессов пищевых производств. М., «Пищевая промышленность», 1967.
40. Головкин Н. А., Перкель Р. Л. Анализ свободных жирных кислот в природных жирах методом газожидкостной хроматографии. Труды ВНИИЖ, вып. 27, с. 247. Л., 1970.
41. Головкин Н. А., Перкель Р. Л. Особенности газохроматографического анализа метиловых эфиров жирных кислот рыбьего жира. Труды ВНИИЖ, вып. 27, с. 253. Л., 1970.
42. Головня Р. В., Уралец В. П. «Газохроматографический анализ сложных смесей монокарбонильных соединений». Сооб. I и II ДАН СССР, т. 177, 1967.
43. Головня Р. В., Журавлева И. Л. О влиянии щелочной обработки носителя на температурную зависимость индексов удерживания органических оснований. Изд. АН СССР. Серия хим., 1967, л. 4.
44. Гольберт К. А., Вигдергауз М. С. Курс газовой хроматографии. М., «Химия», 1967.
45. Горбатов А. В. Реология в мясной промышленности. М., ЦНИИТЭИмясомолпром, 1968.
46. Горбатов А. В., Косой В. Д. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1970, № 2, с. 146.
47. Государственная система промышленных приборов и средств автоматизации. Ч. I. М., Изд. стандартов, с. 301.

48. Гр
II Д. «Рыб
49. Гр
нова А.
1970.
50. Гр
ность». 1969
51. Гу
М., Пищепр
52. Да
ческих соеди
53. Да
№ 7, с. 101.
54. Да
1961, № 1, с.
55. Да
докимов
56. Да
из кильки
водства про
1972.
57. Да
ская промы
58. Де
витаминов.
59. Дет
60. Ди
промышленн
61. Ди
вых продукт
62. Ди
онкологии»,
63. Ди
хозяйство»,
64. Ди
65. Ди
и распростр
века средне
66. Ди
бенз(а)пире
внешней сре
нума Комит
ГСЭУ МЗ С
67. Ди
Долгая М
микробиопро
68. Ди
ское общест
69. Ду
ускоренных
рат канд. ди
70. Ду
71. Дя
«Биохимия»
72. Ег
СССР», 1962
73. Ер
тицидов в б
74. Жу
турных раст

48. Грецкая О. П., Емшанова А. В., Дикун П. П., Горелова Н. Д. «Рыбное хозяйство», 1962, № 3, с. 56.
49. Григоренко Л. Т., Дикун П. П., Калинина И. А., Мирнова А. Н., Ржехин В. П. Труды ВНИИЖ, вып. 27, с. 32, 42, 46. Л., 1970.
50. Гришина Н. Л., Кузнецов Д. И. «Масложировая промышленность». 1969, № 10, с. 6 и 1971, № 6, 8.
51. Гуськов К. П., Мачихин Ю. А. и др. Реология пищевых масс. М., Пищепромиздат, 1970.
52. Дайер Джон Р. Приложения абсорбционной спектроскопии органических соединений. М., «Химия», 1970.
53. Данецкая О. Л., Дикун П. П. «Гигиена и санитария», 1964, № 7, с. 101.
54. Данилов М. М., Кондратенко А. А. «Вопросы питания», 1961, № 1, с. 77.
55. Данилов М. М., Шевченко В. В., Дубская Л. Н., Евдокимов А. М. «Ветеринария», 1971, № 5, с. 108.
56. Данилова А. И. Аминокислотный состав белков рыбной муки из кильки и минтая.— В сб. научных трудов «Вопросы технологии производства продуктов общественного питания», вып. 1, с. 11. М., Изд. МИНХа, 1972.
57. Даурский А. Н., Мачихин Ю. А. «Хлебопекарная и кондитерская промышленность», 1971, № 10, с. 18.
58. Девятнин В. А. Методы химического анализа в производстве витаминов. М., «Медицина», 1964.
59. Детерман Г. Гель-хроматография. М., «Мир», 1970.
60. Дикий Б. Ф. Применение люминесцентного анализа в пищевой промышленности. М., ЦИНТИпищепром, 1961.
61. Дикий Б. Ф. Автоматический контроль состава и свойств пищевых продуктов. М., «Пищевая промышленность», 1968.
62. Дикун П. П., Красницкая Н. Д., Чушкин С. Г. «Вопросы онкологии», 1962, т. 8, № 2, с. 31.
63. Дикун П. П. «Вопросы питания», 1965, т. 24, № 1, с. 31; «Рыбное хозяйство», 1965, № 3, с. 60.
64. Дикун П. П. «Вопросы онкологии», 1965, т. 11, № 2, с. 77.
65. Дикун П. П. Флуоресцентно-спектральное изучение источников и распространенности полициклических углеводов в окружающей человека среде. Автореферат. докт. дисс. Л., 1970.
66. Дикун П. П., Костенко Л. Д. Стандартный метод определения бенз(а)пирена в рыбных и мясных продуктах. Некоторые итоги загрязнения внешней среды канцерогенными веществами. Материалы расширенного пленума Комитета по канцерогенным веществам и мерам профилактики при ГСЭУ МЗ СССР. М., 1972, с. 74.
67. Динанская Э. И., Робышева З. Н., Горобцова Т. А., Долгая М. Б. Методы определения витаминов в дрожжах. М., ОНТИТЭИ-микробиопром, 1974.
68. Дискаина Д. Е. Успехи газовой хроматографии. Всесоюзное химическое общество имени Д. И. Менделеева, вып. 1, с. 91, Казань, 1968.
69. Дубская Л. Н. Сравнительная оценка действующих и изыскание ускоренных лабораторных методов определения свежести рыбы. Автореферат канд. дисс. Л., 1972.
70. Дубская Л. Н. «Рыбное хозяйство», 1973, № 1, с. 76.
71. Дятловицкая Э. В., Торховская Т. И., Бергельсон Л. Д. «Биохимия». Т. 34, с. 177, 1969.
72. Егоров И. А., Радопуло А. К. «Виноделие и виноградарство СССР», 1962, № 8, с. 7.
73. Ермаков В. В. Газохроматографические методы определения пестицидов в биологических средах. М., «Наука», 1972.
74. Жуков А. В., Верещагин А. Г. «Физиология и биохимия культурных растений». Т. 2, вып. 1, с. 93, 1970.

75. Журавская Н., Сулеева Б. «Мясная индустрия СССР», 1974, № 6, с. 36.
76. Запрометов М. Н. Основы биохимии фенольных соединений. М., «Высшая школа», 1974.
77. Запрометов М. Н., Смирнова Г. Г. «Прикладная биохимия и микробиология». Т. 5, вып. 1, с. 65, 1969.
78. Запрягаева А. В., Пучкова Л. И. и др. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1970, № 1, с. 53.
79. Зобова Р. Г., Ходак А. П. «Хлебопекарная и кондитерская промышленность», 1973, № 10, с. 18.
80. Зубрев Н. И., Лурье И. С., Лукьянов А. Б. «Хлебопекарная и кондитерская промышленность», 1973, № 5, с. 20.
81. Ильницкий А. П., Рожкова Л. Г. «Вопросы онкологии», 1970, т. 16, № 7, с. 78.
82. Инихов Г. С., Брио Н. П. Методы анализа молока и молочных продуктов. М., «Пищевая промышленность», 1971.
83. Казидына Л. А., Куплецкая Н. Б. Электронные и колебательные спектры поглощения органических соединений. М., Изд. МГУ, 1965.
84. Капустина В. В., Дудкин М. С. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1972, № 1, с. 19.
85. Касторных М. С., Кулаковская Н. А., Хомутов Б. И., Орлова Т. И., Симонова Т. И. Динамика накопления продуктов окисления при неингибированном и ингибированном автоокислении свиного топленого жира.—В сб. научных трудов «Товароведение пищевых продуктов», вып. 5, с. 96. М., Изд. МИНХа, 1975.
86. Качераускис Д. В., Бержинскас Г. Г. Определение реологических свойств сливочного масла. М., ЦНИИТЭИмясомолпром, 1969.
87. Кельман Л. Ф., Лясковская Ю. Н. «Мясная индустрия СССР», 1965, № 1, с. 52.
88. Кенжебеков П. К. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1972, № 4, с. 36.
89. Керенман И. М. Методы определения органических соединений. М., «Химия», 1975.
90. Клаповский Ю. В., Мачихин Ю. А. «Хлебопекарная и кондитерская промышленность», 1967, № 9, с. 20.
91. Климовский И. И., Алексеев В. Н., Табачников В. П. Отчет ВНИИМС. Углич, Изд. ВНИИМС, 1965.
92. Климовский И. И., Сергеева Е. Г. «Молочная промышленность», 1971, № 8, с. 12.
93. Клисенок М. А., Лебедева Т. А., Юркова З. В. Химический анализ микроколичеств ядохимикатов. М., «Медицина», 1972.
94. Ковалевская Е. И., Куриленко О. Д. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1964, № 1, с. 40.
95. Козин Н. И., Ситников В. В. «Масложировая промышленность», 1967, № 3, с. 15.
96. Козин Н. И., Ситников В. В. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1970, № 2, с. 141.
97. Коларов К. М., Ковалевская Е. И. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1971, № 3, с. 103.
98. Колесник А. А., Лам-Тъи. Изменение количественного аминокислотного состава краснокочанной капусты в процессе хранения.—В сб. научных трудов «Товароведение и технология торговли и общественного питания», вып. 2, с. 24. М., Изд. МИНХа, 1974.
99. Кондратенко А. А., Данилов М. М. «Ветеринария», 1960, № 5, с. 77.
100. Конев С. В. Люминесцентный метод определения белка в молоке и других биологических объектах. Тезисы докладов совещания по применению методов люминесцентного анализа в сельском хозяйстве. Л., 1969, с. 46.

101. Конев С. В., Козлова Г. Г. Использование явления вторичной люминесценции для определения содержания жира в молоке и молочных продуктах. Тезисы докладов совещания по применению методов люминесцентного анализа в сельском хозяйстве. Л., 1969, с. 48.
102. Конев С. В., Козунин И. И. Методы люминесцентного анализа. Доклады конференции. Минск, 1960, с. 137.
103. Конев С. В., Лыскова Т. И., Салощенко П. Н. «Биофизика». Т. 8, вып. 2, с. 260, 1963.
104. Король А. Н. Неподвижные фазы в газожидкостной хроматографии. Киев, «Наукова думка», 1969.
105. Косматый Е. С., Шляпак С. И. «Вопросы питания», 1963, т. 22, № 5, с. 83.
106. Кочетавкин А. В., Фофанов В. Н.—В кн.: «Влияние свойств почв и удобрений на качество растений». М., 1972, с. 206.
107. Кошечев А. К., Добросердова Н. И., Лившиц О. Д. «Гигиена и санитария», 1971, № 12, с. 65.
108. Кошечев А. К., Лившиц О. Д. «Гигиена и санитария», 1974, № 8, с. 57.
109. Кравченко Н. А., Клеопина Г. В. Руководство по хроматографическому анализу аминокислот на колонках. М., «Наука», 1964.
110. Кржевова Р. В., Горелик Л. Д. и др. Методы определения остаточных количеств пестицидов в плодовоовощном сырье и готовой продукции. Труды ВНИИКОП, вып. 16, с. 112. М., 1972.
111. Крылова Н. Н., Базарова К. И. Изучение содержания летучих жирных кислот мяса в процессе технологической обработки. Труды ВНИИМП, вып. 22, с. 152. М., 1970.
112. Крылова Н. Н., Лясковская Ю. Н. Физико-химические методы исследования продуктов животного происхождения. М., «Пищевая промышленность», 1965.
113. Кузнецов Д. И., Гришина Н. Л. «Вопросы питания», 1968, № 1, с. 72.
114. Кузнецов Д. И., Семенова Л. И. «Масложировая промышленность», 1974, № 3, с. 20.
115. Куриленко О. Д., Кабан А. А., Недужий А. А. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1961, № 1, с. 12.
116. Курко В., Кельман Л. «Мясная индустрия СССР», 1963, № 6, с. 50.
117. Куркова М. Ф. и др. «Масложировая промышленность», 1970, № 5, с. 3.
118. Кушинская И. Н., Шнайрман Л. О. «Медицинская промышленность СССР», 1964, № 4, с. 38.
119. Лапшин И. И., Родина Т. Г. «Рыбное хозяйство», 1967, № 12, с. 63.
120. Левшин В. Л., Левшин Л. В. Люминесценция и ее применение. М., «Наука», 1972.
121. Липис Б. В., Мамакова З. А. «Виноделие и виноградарство СССР», 1963, № 3, с. 7.
122. Литвинов Л. Д., Руденко Б. А. Газовая хроматография в биологии и медицине. М., «Медицина», 1971.
123. Ловачев Л. Н., Родионова Н. Ф., Зеленцов О. А. Труды Литовского филиала ВНИИМС. Т. VII, с. 371. Вильнюс, Изд. Минтас, 1973.
124. Ловачев Л. Н., Родионова Н. Ф., Шишкин И. Н. Применение тонкослойной хроматографии для определения фракционного состава липидов.—В сб. научных трудов «Товароведение и технология торговли и общественного питания», вып. 5, с. 196. М., Изд. МИНХа, 1973.
125. Лунин Л. Н., Мачихин Ю. А. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1968, № 4, с. 133.
126. Лурье А. А. Сорбенты и хроматографические носители. М., «Химия», 1972.

127. Львов Б. В. Атомно-абсорбционный спектральный анализ М., «Наука», 1966.
128. Люминесцентный анализ. Под ред. Константиновой-Шлезингер М. А. М., Государственное изд-во физико-математической литературы, 1961.
129. Ляликов Ю. С. Физико-механические методы анализа. М., «Химия», 1974.
130. Лясковская Ю. Н., Шмидт Е. Т. Труды ВНИИМП, вып. 22, с. 34. М., 1970.
131. Мак-Нейр Г., Бонелли Э. Введение в газовую хроматографию. М., «Мир», 1970.
132. Маршалкин Г. А., Егоров В. А., Карпин Б. А. «Хлебопекарная и кондитерская промышленность», 1970, № 12, с. 14.
133. Маршалкин Г. А., Раббата М., Прокопенко А. Д. «Хлебопекарная и кондитерская промышленность», 1973, № 7, с. 13.
134. Материалы совещания по витаминам из природного сырья Куйбышев, 1964, с. 5.
135. Мачихин С. А. «Исследование процесса формирования бараночных изделий и реологических свойств теста». Автореферат канд. дисс. М., Изд. МТИПП, 1965.
136. Методические указания по определению канцерогенных полициклических ароматических углеводородов, в частности бенз(а)пирена, в различных промышленных и природных продуктах. Составители П. П. Дикуи, А. Я. Хесина, Р. М. Федорович. М., МЗ СССР, 1972.
137. Методы анализа пищевых сельскохозяйственных продуктов и медицинских препаратов. Пер. с англ. под ред. А. Ф. Наместникова. М., «Пищевая промышленность», 1974.
138. Методы биохимического исследования растений. Под ред. А. И. Ермакова. Л., «Колос», 1972.
139. Методы определения пестицидов в пищевых продуктах. Сб. статей под ред. А. А. Покровского и А. И. Штейнберга. М., «Медицина», 1965.
140. Методы-спутники в газовой хроматографии. Под ред. Л. Эттр и Х. Мак-Фадден. Пер. с англ. С. А. Орловского под ред. В. Г. Березкина. М., «Мир», 1972.
141. Минчук Ф. Л., Зинченко В. И., Крохмалюк В. В. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1975, № 4, с. 154.
142. Молев Н. А. Флуоресцентные свойства молока и некоторые вопросы их использования в практике животноводства. Тезисы докладов совещания по применению методов люминесцентного анализа в сельском хозяйстве. Л., 1969. с. 62.
143. Молочников В. В., Мочалов В. И. Определение остатков пестицидов в молоке и молочных продуктах методом газовой хроматографии. М., ЦНИИТЭИмясомолпром, 1970.
144. Мохначев И. Г., Лещенко В. В. «Консервная и овощесушильная промышленность», 1964, № 7, с. 29.
145. Мхитарян С. С., Нечаев А. П., Денисенко Я. И., Яновский М. Ц. «Прикладная биохимия и микробиология». Т. 5, вып. 4, с. 509, 1969.
146. Назаров В. И., Тесленко О. С. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1961, № 1, с. 7.
147. Нейман И. М. Канцерогены и пищевые продукты. М., «Медицина», 1972.
148. Никифорова В. Н., Чухрова Т. И. и др. «Хлебопекарная и кондитерская промышленность», 1971, № 7, с. 18.
149. Николаев Б. А. Измерение структурно-механических свойств пищевых продуктов. М., «Экономика», 1964.
150. Николаев Б. А., Абдулина Р. М. Сб. научных трудов «Вопросы повышения качества и хранения продовольственных товаров». М., Изд. Московского кооперативного института, 1967.
151. Новиков Ю. В., Гуров Ф. И. «Гигиена и санитария», 1970, № 12, с. 74.

152. Новицкая Г. В. Методическое руководство по тонкослойной хроматографии липидов. М., «Наука», 1972.
153. Новожилова Г. Н., Денисенко Я. И., Нечаев А. П., Шнайман Л. О. «Прикладная биохимия и микробиология». Т. 4, вып. 3, с. 333, 1968.
154. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков. Пер. с англ. под ред. Ю. А. Овчинникова. М., «Мир», 1974.
155. Ногаре С. Д., Джувет Р. С. Газожидкостная хроматография. Л., «Недра», 1966.
156. Нориков Ю. Д., Базарова К. И., Литвинов Л. Д. «Мясная индустрия СССР», 1967, № 3, с. 35.
157. Оводов Ю. С. Газожидкостная хроматография углеводов. Обзор. Владивосток, 1970.
158. Ольшанова К. М., Потапова М. А., Морозова Н. М. Практикум по хроматографическому анализу. М., «Высшая школа», 1970.
159. Основы жидкостной хроматографии. Пер. с англ. под ред. А. А. Жуховицкого. М., «Мир», 1973.
160. Осокин Ю. Г., Фельдблюм В. С., Крюков С. Н. «Нефтехимия», 1966, № 6, с. 333.
161. Острякова Е. Б., Черногородцев А. П. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1968, № 6, с. 24.
162. Перри С., Амос Р., Брюер П. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. Пер. с англ. под ред. К. В. Чмутова. М., «Мир», 1974.
163. Петров И. К. Технологические измерения и приборы в пищевой промышленности. М., «Пищевая промышленность», 1973.
164. Покровский А. А. Журнал ВХО имени Д. В. Менделеева. 1965, № 10, с. 3.
165. Пояркова Г. С., Белов А. Н., Воеводина Л. Н. Определение свободных летучих жирных кислот в сливочном масле методом газожидкостной хроматографии. Труды ВНИИМС, вып. 9, с. 230. Ярославль, 1972.
166. Пояркова Г. С., Бузов И. П., Воеводина Л. Н. Метод определения содержания липидов в сладкосливочном масле. Труды ВНИИМС, вып. 10, с. 184, «Пищевая промышленность», 1973.
167. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. М., «Колос», 1968.
168. Препаративная газовая хроматография. Под ред. А. Златкис и В. Преториус. Пер. с англ. под ред. В. Г. Березкина и К. И. Сакодынского. М., «Мир», 1974.
169. Приборы для хроматографии. М., «Машиностроение», 1973.
170. Применение газовой хроматографии в рыбной промышленности. Пер. с японск. М., ЦНИИТЭИРХ, вып. 3, 1969.
171. Пучкова Ю. С., Ловачев Л. Н. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1972, № 5, с. 75.
172. Раманаускис Р. Труды Литовского филиала ВНИИМС. Т. II, с. 139, 1968.
173. Родина Т. Г. Применение копильной жидкости МИНХ для производства рыбных консервов в масле. Канд. дисс. М., 1967.
174. Родопуло А. К., Егоров И. А., Писарницкий А. Ф. «Виноделие и виноградарство СССР», 1963, № 3, с. 11.
175. Руководство по газовой хроматографии. Под ред. Э. Лейбнитца и Г. Г. Штруппе. Пер. с нем. под ред. А. А. Жуховицкого. М., «Мир», 1969.
176. Руководство по методам исследования, теххимическому контролю и учету производства в масложировой промышленности. Т. I, книга 1, с. 270. Л., ВНИИЖ, 1967.
177. Сакун В. А. Сушка и активное вентилирование зерна и зеленых кормов. М., «Колос», 1974.
178. Самородова-Бианки Г. Б. «Физиология растений». Т. 15, вып. 4, с. 704, 1968.

179. Самородова-Бианки Г. Б. Методика изучения некоторых биологически активных веществ плодов яблони. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. Т. 48, вып. 1, с. 195. Л., 1972.
180. Самородова-Бианки Г. Б., Базарова В. И. «Физиология растений». Т. 17, вып. 1, с. 189, 1970.
181. Самсонова А. И., Цисин А. Д., Ткаченко И. П. «Хлебопекарная и кондитерская промышленность», 1971, № 10, с. 15.
182. Самуйленко А. И. ДАН БССР, т. 10, № 2, с. 115, 1966
183. Силантьева А. Г., Снегирева И. А. «Вопросы питания». 1969, № 6, с. 72.
184. Скробанский Г. Г., Парамонова Т. Н. Экспресс-информация ЦНИИТЭИпищепром. «Консервная промышленность», вып. 9, с. 17, М., 1975.
185. Слонимский Г. Л., Алексеев В. Ф. и др. «Высокомолекулярные соединения». Т. А/XI, № 2, с. 460, 1969.
186. Смирнова Г. А., Бондарева Э. С. Хроматография белков некоторых зернобобовых культур на гелях сефадекса.—В сб. научных трудов МИНХа «Изменение пищевых веществ под действием кулинарной обработки», вып. 41, с. 106. М., 1966.
187. Смирнова Г. А., Шарунайте В. Изучение фракционного состава белков гречневой крупы.—В сб. научных трудов МИНХа «Изменение пищевых веществ под действием кулинарной обработки», вып. 41, с. 122. М., 1966.
188. Снегирева И. А. О жирнокислотном составе фосфатидных концентратов.—В сб. научных трудов ЗИСТ «Качество и хранение пищевых продуктов», вып. 5, с. 3. М., 1973.
189. Славин У.- Атомно-абсорбционная спектроскопия. Л., «Химия», 1971.
190. Современное состояние жидкостной хроматографии. Под ред. Д. Киркланда. Пер. с англ. Д. Д. Новикова. М., «Мир», 1974.
191. Сокольская Е. В., Висневская Г. Л., Егоров А. С. Идентификация сложных эфиров и альдегидов методом бумажной хроматографии. Труды Украинского НИИ спиртовой и ликеро-водочной промышленности, вып. 9, с. 38, 1964.
192. Соловьева Е. И., Любивая А. И., Кабанова Н. Н., Сташина В. М. «Консервная и овощесушильная промышленность», 1974, № 11, с. 38.
193. Сосновский А. Г., Столярова Н. И. Измерение температур. М., Изд. стандартов, 1970.
194. Степанова Ф. П. Изменчивость фенольных соединений в процессе созревания и хранения яблок и их связь с товароведными свойствами плодов. Канд. дисс. Л., 1972.
195. Степчиков К. А., Кузнецова Л. И. «Консервная и овощесушильная промышленность», 1963, № 6, с. 23.
196. Столяров Б. В. Руководство к практическим работам по газовой хроматографии. Л., Изд. ЛГУ, 1973.
197. Тарасов К. И. Спектральные приборы. Л., «Машиностроение» 1968.
198. Толстогозов В. Б., Изюмов Д. Б. «Высокомолекулярные соединения». Т. А/XII, с. 1872, 1970.
199. Триппель А. И. «Известия вузов СССР. Пищевая технология». 1963, № 5, с. 155.
200. Уманская А. Н., Сафронова Н. Н. и др. «Прикладная биохимия и микробиология». Т. 9, вып. 3, с. 468, 1973.
201. Успенская Ж. Ф., Кретович В. П. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге.—В сб. «Методика количественной бумажной хроматографии сахаров, органических кислот и аминокислот у растений». М.—Л., Изд. АН СССР, 1962.
202. Фатеева М. В. «Прикладная химия», т. 38, вып. 11, с. 468, 1965.

203. Харрис В., Хэбгуд Г. Газовая хроматография с программированием температуры. М., Мир, 1968.
204. Харченко Л. Н. «Масложировая промышленность», 1968, № 12, с. 12.
205. Хроматография в тонких слоях сорбента. Под ред. Э. Шталя. М., «Мир», 1965.
206. Хроматография на бумаге. Под ред. И. Хайса и К. Мацека. М., ИЛ, 1962.
207. Цагарели К. К., Кереселидзе Ц. Г. Спектрофотометрический метод определения кофеина. Труды ГрузНИИпищепрома, 1971, № 5, с. 116.
208. Цирульников В. Д., Гришин А. С. «Хлебопекарная и кондитерская промышленность», 1967, № 7, с. 16.
209. Чимиров Ю. И., Изюмов Д. Б., Толстогузов В. Б. Труды МННХА, вып. 60. М., 1974.
210. Шабанова И. А. «Биохимия». Т. 32, вып. 6, с. 1155, 1967.
211. Шеллард Э. Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое. М., «Мир», 1971.
212. Шмидт А. А., Цивина Н. З., Усенко В. Ф. Чекмарева И. Б. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1972, № 4, с. 170.
213. Шнайдман Л. О., Шугам Н. А. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1966, № 2, с. 39.
214. Щербак Н. П. «Вопросы онкологии». Т. 15, № 8, с. 112, 1969.
215. Щербаков В. Г., Малышев А. М. «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1967, № 6, с. 15.
216. Эйрих М. Реология. М., ИЛ, 1962.
217. Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М., «Мир», 1965.
218. Юдницкая А. И., Лебедева Т. М. «Рыбное хозяйство». 1965, № 9, с. 75.
219. Якубов Г., Донцова Н. «Мясная индустрия СССР». 1973, № 6, с. 34.
220. Якивчук А. П. Метод определения лейкоантоцианов в вине. Республиканский межведомственный научно-технический сборник. Вып. 4, Киев, «Техника», 1970.
221. Bergeret J. "Vignes et Vins". 1962, N 112, 37.
222. Biol M., Foulonneau C. "Vignes et Vins", 1962, N 113, 13.
223. Biol H., Michel A. "Vignes et Vins". 1962, N 111, 9.
224. Brauw M. C., Brunce C. "Z. Anal. Chem.". 1967, 229, 321.
225. Dinilli D. "Rivista-Olii Vegetali-saponi". 1962, 44, 264.
226. Dravert F. "Vitr". 1960, 2, 172.
227. Gehrke C. W., Roach D., Zumwalt R. W., Stalling D. L., Wall L. L. Quantative Gas-Liquid Chromatography of Amino Acids in Proteins and Biological Substances, Analytical Biochemistry laboratories, Columbia, Missouri, 1968.
228. Guiochon G., Goedert M. "Chimie analytique", 1971, N 4, 214.
229. Heintz D. E., Revenant M. R., Jennings W. G. J. Food Sci., 1966, 31, 63.
230. Hörhamer L. Methodes in Polyphenol chemistry, Oxford, 1969, 89.
231. Hultin H. O., Proctor R. E. Food Technol. 1961, 15, 440.
232. King F. J. J. Food Sci. 1966, v. 31, N 5, 649.
233. Kernner R. E., Maapre H., Strating I. Analyt. Chem. 1964, 36, 77.
234. Mehlitz A., Gierrchner K. Riebstoffe und Aromen, 1962.
235. Merritt C. Jr., Walsh I. T. J. Gas. Chromatogr. 1967, 5, 420.
236. Muel B., Lacroix G. Bull. Soc. Chim. France. 1960, N 11, 12, 2139.

237. Navarra J., Gerne T. Duquesne Science Counselor. 1962, v. 25, N 3, 66, 84.
238. Ocker H. D. Brot und Gebäck. 1961, 15, 134.
239. Rogznski M. J. Gas-Chromatography. 1964, N 2, 136.
240. Reymond D., Mugger-Chavan F., Viani R., Egli R. N. "Journal of Gas-Chromatography", 1966, vol. 4, N 1, p. 28—31.
241. Seher A. "Über die Zuverlässigkeit der Ergebnisse", Fette Seifen — Anstrichmittel. 1966, N 4, 255.
242. Sheppard A. J., Prosser A. R. and Hubbard W. D. Journal of the American Oil Chemists Society. 1972, N 11, 619.
243. Slover H. T., Shelley L. M., Burks T. L. Lbid. 1967, N 3, 161.
244. Smith L. M. Journal of Dairy Science. 1961, 44, 607.
245. Spanyar P., Kevei I., Kissel L. Kosponti elemirzeripari Kutato interet körlemenyei. 1960, 3, 9.
246. Stegemann H. "Z. Physiol. Chem.", 1960, v. 319, 102.
247. Valis C., Garcia-Olmedo R. "An Bromatol", 1963, v. 15, N 2, 127.
248. Wick E. L. "Food Technology", 1965, v. 19.
249. Wickremasinghe R. L., Swain T. "Journal of the Science of Food and Agric.", 1965, v. 16, N 1, p. 57—64.
250. Hadorer H., Kleinert I. "Rev. intern. chocolat", 1967, 22, № 8, 312—319.
251. Laury M., Garber L. "Rev. Française corps gras", 1968, 5, № 5, № 5, 301—308.

Аминокислоты
— хромато
140—141, 152—
Анализ аром
— вина 89
— кофе 87,
— хлеба 87
— чая 87, 9

Белки — люм
— хромато
— экстрак

Вискозиметр
вальда, Убел
— ротацио
— шарико
Витамины —
167—169
— хромато
Вязкость 17
188, 191, 193

Детекторы
— общие
— свойст
— типы 5
Деформаци
Динамомет
Дистанцион
ности 202—
— темпер

Идентифик
Индикатор
— хемил

Канцероген
сентный
Каротиноид
131
Катехины

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

- Аминокислоты — выделение 152, 153
- хроматография 83, 84, 110—112, 140—141, 152—154
- Анализ аромата — бананов 91
- вина 89
- кофе 87, 88
- хлеба 87
- чая 87, 93, 97

Б

- Белки — люминесцентный анализ 166
- хроматография 156, 157
- экстракция 156

В

- Вискозиметр — капиллярный Ост-вальда, Убеллоде 190
- ротационный Воляровича 185
- шариковый Гепплера 191
- Витамины — люминесцентный анализ 167—169
- хроматография 82, 83, 130—133
- Вязкость 174, 176, 179, 181, 184, 186, 188, 191, 193, 196

Д

- Детекторы 52—55
- общие требования 53
- свойства 52
- типы 53—55
- Деформация 174
- Динамометрические весы 196—199
- Дистанционное измерение — влажности 202—205
- температуры 202—205

И

- Идентификация 58—61, 99—102
- Индикаторы — флуоресцентные 173
- хемилюминесцентные 173

К

- Канцерогенные вещества — люминесцентный анализ 169—171
- Каротиноиды — хроматография 130, 131
- Катехины — хроматография 146, 147

- Кислоты — метилирование 71—72, 150—151
- разделение 72—74
- хроматография 69—79, 106, 137—139
- Колонки хроматографические 55—57, 141, 142
- Конический пластометр 193—195
- Контроль автоматизированный 200—202
- Кривая кинетики деформации 177

Л

- Лейкоантоцианы — хроматография 146, 147
- Липиды — выделение 70
- люминесцентный анализ 163, 166
- перэтерификация 71, 72
- хроматография 126—128
- Логометры 203
- Люминесценция 153
- Люминесцентный анализ 158—173
- качественный 171
- количественный 171
- основы метода 158—161
- приборы 161, 163—168, 171, 172
- применение для исследования 162—172
- — белков 166
- — витаминов 167—169
- — жиров 163, 166
- — канцерогенных веществ 169—172
- — молочных продуктов 162, 163, 166
- — муки 163
- — мяса 163—165
- — пестицидов 172
- — плодов и овощей 162
- — рыбы 164, 165
- — солей тяжелых металлов 172
- — яиц 163, 164

М

- Метод дистилляции 89—93
- Методы расчета хроматограмм 63—66
- Милливольтметры 205
- Модели идеальных тел 175, 176

Мосты — неуравновешенные 204
— уравновешенные 204

II

Напряжение 174

II

Пестициды — люминесцентный анализ 172
— хроматография 55, 79, 82, 106, 133—137
Предельное напряжение сдвига 181, 186, 194
Приборы для измерения деформации 180, 181, 195
— Вейлера — Ребиндера 180
— Николаева 181
— Николаева — Шпигельгляса 195
Пластичность 179
Податливость 198
Ползучесть 175
Потенциометры 205
Прочность 175
Релаксация 174
Реология 174
Сахара — хроматография 84, 110
Светофильтры 161, 167—169, 171, 172
Сорбенты 113—116
Спектроскопия 6
— адсорбционная 6—12
— — закон спектроскопии 24—27
— — молярный коэффициент поглощения 9, 10
— — фотометрические величины 11
— — хромоформные группы 11, 12
— — применение для анализа 12—24
— — — антоцианов 19, 20
— — — катехинов 20, 21
— — — кофеина 21—23
— — — лейкоантоцианов 19, 20
— — — миоглобина мяса 22, 23
— — — окисленности жира 12—14
— — — пектиновых веществ 15, 16
— — — теобромина 22, 23
— — — фенольных соединений 17—24
— атомно-абсорбционная 34—46
— — беспламенная 45, 46
— — выбор пламени 40
— — источники света 41
— — особенности определения отдельных элементов 41—45
— — — железа 43
— — — калия 42
— — — кальция 42, 43, 45
— — — магния 42, 43

— — — марганца 44
— — — меди 43, 44
— — — натрия 42
— — — цинка 44, 45
— — подготовка проб 37
— — теоретические основы 34—37
— инфракрасная 27—34
— — получение спектра 29, 30
— — расшифровка ИК-спектров 30—34
— — — аминокислот 33
— — — ангидридов карбоновых кислот 33
— — — ацетилена 31
— — — гидроксильных групп 31, 32
— — — карбонильных соединений 32
— — — карбоновых кислот 32
— — — первичных аминов 33
— — — углеводов 31, 33
— — — эфиров 33
— эмиссионная 6

C

Спектрофотометр 35—37
Структуры — коагуляционные 172
— конденсационно - кристаллизационные 172

T

Термистеры 204
Термометры сопротивления — полупроводниковые 203
— проволочные 203
Термопары 204
Токоферолы — хроматография 82, 83, 131—133
Триглицериды — хроматография 83

У

Углеводы — хроматография 84, 139, 140
Упругость 175, 179
Условно-мгновенный модуль упругости 179

Ф

Фенолы — хроматография 106—109
Флуоресценция 158—173
Фосфолипиды — хроматография 128—130
Фосфоресценция 158
Фракционирование запахов 98—103

X

Хроматография 47
— адсорбционная 48, 50, 117, 143, 145—147

— — катехинов и лейкоантоцианов 146—147

— бумажная 103—112

— — аминокислот 110—112

— — пестицидов 106

— — сахаров 110

— — фенолов 106—109

— вытеснительная 49

— газовая 48, 49, 50

— — аминокислот 83—84

— — витаминов 82, 83

— — высших жирных кислот 69—

77

— — летучих жирных кислот 77—

79

— — молочного жира 76, 77, 78

— — пестицидов 55, 79—82

— — рыбьего жира 75, 76

— — сахаров 84

— — токоферолов 82, 83

— — триглицеридов 83

— — углеводов 84, 85

— гель-фильтрационная 48, 50, 141, 143, 154—157

— — белков 156, 157

— жидкостная 48—50, 141—143, 148

— ионообменная 48, 141, 143, 148—

154

— — аминокислот 152—154

— качественная 58—61, 104, 105, 123, 124

— классификация 48—50

— количественная 61—66, 105, 106, 124, 125

— колоночная 49, 50, 113—157

— — аминокислот 113—141

— — катехинов 146, 147

— — лейкоантоцианов 146, 147

— молекулярно-ситовая 154—157

— — белков 156, 157

— принцип метода 47, 48, 50—52, 103—106, 113, 141—146, 148—149, 154—155

— проявительная 48, 49, 51

— распределительная 48, 103—112, 143, 144

— тонкослойная 49, 50, 76, 113—141

— — аминокислот 140

— — витаминов 130—133

— ди- и трикарбоновых кислот 137—139

— — каротиноидов 130—131

— — липидов 126—128

— — пестицидов 133—137

— — токоферолов 131—133

— — углеводов 138—140

— — фосфолипидов 128—130

— фронтальная 48

— эксклюзионная 154—157

Х

Хроматограф газовый 51, 52

Хроматографические пики 61—63

Хроматографическое разделение веществ, обуславливающих аромат продуктов 93—98

Э

Эластичность 175, 179

Экстракция — газовая 87, 83

— органическими растворителями 88, 89

СОДЕРЖАНИЕ

1. Значение современных методов исследования пищевых продуктов	
<u>А. Н. Рукосуев</u>	3
2. Спектральные методы исследования пищевых продуктов (О. Б. Церевитинов)	6
2.1. Абсорбционная спектроскопия	6
2.2. Источники ошибок спектрального анализа	24
2.3. Инфракрасная спектроскопия	27
2.4. Атомно-абсорбционная спектроскопия	34
3. Хроматографические методы исследования пищевых продуктов (И. А. Снегирева)	47
3.1. Основы теории и виды хроматографии	47
3.2. Газовая хроматография (ГХ)	50
3.3. Распределительная хроматография на бумаге (Т. Г. Родина)	103
3.4. Тонкослойная хроматография (ТСХ)	113
3.5. Колоночная хроматография	141
4. Люминесцентные методы исследования пищевых продуктов (Т. Г. Родина)	158
4.1. Основы метода	158
4.2. Определение доброкачественности пищевых продуктов	162
4.3. Определение химического состава пищевых продуктов	165
4.4. Флуоресцентные и хемилюминесцентные индикаторы	173
5. Реологические методы исследования пищевых продуктов (Ю. Н. Жванко)	174
5.1. Основные понятия реологии	174
5.2. Типы структур и методы определения реологических свойств	176
5.3. Приборы для определения основных реологических характеристик	179
6. Приборы и технические средства для контроля качества пищевых продуктов (В. Д. Михайлов)	200
6.1. Классификация автоматизированных методов определения состава и свойств пищевых продуктов	200
6.2. Требования к техническим средствам для автоматизированного контроля	200
6.3. Дистанционное измерение температуры и влажности сыпучих пищевых продуктов	202
Литература	209
Предметный указатель	219

С 56 Современные методы исследования качества
пищевых продуктов. М., «Экономика», 1976.
222 с.

В книге изложены основы физико-химических методов оценки качества продуктов питания, а также значение этих методов для определения пищевой ценности, рациональных условий хранения и использования. Подробно рассматриваются спектральные, хроматографические, люминесцентные и реологические методы исследования пищевых продуктов, сущность, виды и возможности практического применения каждого метода.

Книга представляет интерес для научных работников и специалистов, занимающихся исследованием пищевых продуктов и определением их качества.

С $\frac{31700-105}{011(01)-76}$ 160-76

6П9.85

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КАЧЕСТВА
ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Редактор В. Е. МИХАЛЕНКО
Мл. редактор Ю. В. МАЛАШИНА
Худож. редактор А. Н. МИХАЙЛОВ
Техн. редактор Г. В. ПРИВЕЗЕНЦЕВА
Корректор А. С. РОГОЗИНА

Сдано в набор 4/II 1976 г. Подписано к печати 8/VI 1976 г. А-04123.
Формат 60×90¹/₁₆. Печ. л. 14,0. Уч.-изд. л. 14,9. Изд. № 3825. Тираж
15 000 экз. Цена 1 р. 13 к. Заказ № 437. ТП изд. «Экономика» 1976 г.
№ 160. Бумага типографская № 2.

Издательство «Экономика»
121864. Москва, Г-59, Бережковская наб., 6.

Ленинградская типография № 4 Союзполиграфпрома при Государ-
ственном комитете Совета Министров СССР по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли, 196126, Ленинград, Ф-126, Социали-
стическая ул., 14.

А-04123.
Тираж
1976 г.

Государ-
ств, Социали-

1p. 127.



GOVERNMENT OF THE DISTRICT OF COLUMBIA
OFFICE OF THE ATTORNEY GENERAL
JANUARY 19, 1900
RECEIVED
JAN 20 1900
OFFICE OF THE ATTORNEY GENERAL
WASHINGTON, D. C.